

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**Институт химии**

**Направление подготовки:** *Химия*

**Образовательная программа:** *Химия*

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

*Модификация методов*

*количественного хроматографического анализа*

*с использованием дополнительных стандартов*

Студент 2 курса

*Прокофьев Денис Витальевич*

Уровень образования:

*магистратура*

Научный руководитель:

*профессор, доктор химических наук*

*Зенкевич Игорь Георгиевич*

Санкт-Петербург

*2017*

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	5
1.1. Основные методы количественного хроматографического анализа.....	5
1.1.1. Метод внешнего стандарта (одного эталона).....	6
1.1.2. Метод абсолютной градуировки .....	7
1.1.2.1. Проверка соответствия регрессионного уравнения экспериментальным данным с помощью числовых параметров .....	10
1.1.3. Метод стандартной добавки.....	12
1.1.4. Метод последовательных стандартных добавок .....	12
1.1.5. Метод внутреннего стандарта.....	14
1.1.6. Метод двойного внутреннего стандарта.....	16
1.1.7. Метод внутренней нормализации .....	16
1.2 Выводы из литературного обзора .....	18
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	20
2.1. Приборы и реактивы.....	20
2.2. Приготовление модельных растворов .....	23
2.3. Обработка результатов измерений и оценка их погрешности .....	24
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	25
3.1. Выявление потерь проб на стадии их дозирования при помощи построения гистограмм .....	25
3.2. Общая характеристика дополнительного стандарта.....	27
3.2.1. Дополнительный стандарт. Определение. Сравнение с внутренним стандартом.....	27
3.2.2. Относительные параметры аналит/дополнительный стандарт .....	29
3.2.3. Стабильность относительных параметров в условиях разбавления пробы и варьировании её объёма при вводе в хроматографическую систему .....	31

3.3. Модификация методов количественного анализа за счет использования дополнительного стандарта .....	34
3.3.1. Метод внешнего стандарта .....	34
3.3.2. Метод стандартной добавки.....	36
3.3.3. Метод абсолютной градуировки .....	37
3.3.4. Растворитель пробы в качестве дополнительного стандарта .....	41
3.4. Проверка применимости модифицированных методов количественно анализа в методах ВЭЖХ и КЗЭ.....	43
Выводы .....	45
Список литературы.....	46
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	49

## ВВЕДЕНИЕ

Одно из основных применений хроматографических методов состоит в количественном определении целевых компонентов с использованием различных методов количественного анализа: внешнего стандарта, абсолютной градуировки, стандартной добавки, внутреннего стандарта и внутренней нормализации. Каждый из этих методов может быть реализован в нескольких вариантах, но общим условием трех первых является необходимость обеспечения максимальной абсолютной воспроизводимости дозирования анализируемых проб в хроматограф для достижения максимально высокой повторяемости абсолютных площадей пиков и снижения случайных составляющих погрешностей определений [1].

Особые сложности в работе вызывает то, что выявление потерь проб при дозировании в хроматограф образцов с неизвестными содержаниями определяемых компонентов представляет собой сложную задачу. Таким образом, прецизионность «традиционных» вариантов методов внешнего стандарта, абсолютной градуировки и стандартной добавки чрезвычайно чувствительна к неконтролируемым потерям проб при их дозировании в хроматограф, что может приводить к неприемлемо большим ошибкам количественных определений. Следовательно, в случаях, когда наблюдаются значительные потери проб на стадии их дозирования необходимо модифицировать эти методы с целью компенсации погрешностей, обусловленных случайными вариациями дозируемых количеств аналитов.

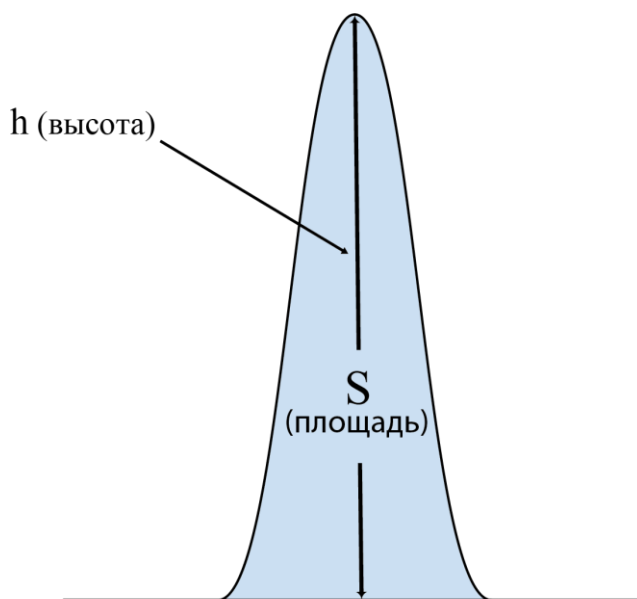
Именно поэтому настоящая работа посвящена разработке способа компенсации случайной составляющей погрешностей определений площадей пиков аналита, в таких методах количественного анализа, как внешний стандарт, абсолютная градуировка и стандартная добавка. Принцип такой компенсации основан на замене абсолютных значений площадей (высот) пиков аналитов относительными параметрами – отношениями площадей пиков «аналит/дополнительный стандарт», что значительно повышает прецизионность количественных определений. При этом нет никаких ограничений на физико-химические свойства дополнительных стандартов, что выгодно отличает разрабатываемый подход от метода внутреннего стандарта.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Основные методы количественного хроматографического анализа

Количественный анализ - это определение абсолютного или относительного содержания (часто выражается в виде концентрации) одного, нескольких или всех компонентов образца.

Первостепенной задачей количественного анализа является градуировка прибора, а именно, установление строгой функциональной связи между определённым физическим свойством, принадлежащим интересующему нас соединению и его содержанием в образце [2]. В случае количественного хроматографического анализа, исходят из предположения, что площади пиков (или высоты) (рис. 1), соответствующие индивидуальным соединениям на хроматограмме, пропорциональны содержанию этих веществ в пробе. Таким образом, хроматографический анализ не является абсолютным (гравиметрия, кулонометрия и др.), а прослеживается до четко определенного градуировочного стандарта.



**Рисунок 1.** Количественные параметры хроматографического пика  
(площадь и высота)

Измерение высот пиков может быть проведено с высокой точностью и дает точные результаты, если в результате элюирования аналита не происходит изменения ширины его пика. Поскольку высота пика обратно пропорциональна его ширине (при нормальном распределении), все параметры, которые могут влиять на ширину пика следует поддерживать постоянными. Параметрами, влияющими на высоту пика, яв-

ляются: время удерживания, эффективность системы (число теоретических тарелок) и коэффициент асимметрии пика. Когда время удерживания увеличивается, происходит уширение пика и высота пика уменьшается. Уменьшение числа теоретических тарелок и увеличение (уменьшение) коэффициента асимметрии также уменьшают высоту пика. В отличие от высоты, площадь пика практически не зависит от уширяющих пик эффектов. Поэтому площадь пика является более предпочтительным количественным аналитическим параметром, чем высота пика [3].

В современных приборах площади пиков измеряют с высокой правильностью и повторяемостью, даже если они не симметричны, поэтому, площадь пика обычно является рекомендуемым параметром для количественных определений. Высоты и площади пиков зависят от свойств аналита и детектора. Поэтому для определения неизвестных концентраций аналита градуировочные кривые должны быть подготовлены для каждого анализируемого вещества и предпочтительно в том же растворителе, что и проба.

Существует несколько методов количественного анализа, среди которых наиболее распространены методы - внешнего стандарта, абсолютной градуировки, стандартной добавки, внутреннего стандарта и внутренней нормализации. Важно отметить, что универсального метода количественного анализа нет. Метод выбирают в зависимости от множества условий. Прежде всего, от необходимых исследователю характеристик точности (правильности и прецизионности) результатов количественных определений. Кроме этого важны, характер и количество исследуемых образцов, а также минимальные затраты времени и расход реактивов на пробоподготовку и приготовление градуировочных растворов.

#### **1.1.1. Метод внешнего стандарта (одного эталона)**

Метод внешнего стандарта является наиболее простым методом количественного анализа и используется в тех случаях, когда необходимо быстро оценить абсолютное содержание интересующего соединения или нет возможности приготовления искусственных смесей с разным содержанием целевого компонента ввиду малого количества стандартного образца. Кроме этого, частый количественный анализ методом внешнего стандарта может обеспечить более точные результаты, чем редкая абсолютная калибровка, если отклик детектора изменяется со временем [4,5], так как не

требует использования градуировочных уравнений с заранее определёнными параметрами. Используя метод внешнего стандарта необходимо быть уверенным в линейности области показаний детектора и небольшом матричном влиянии пробы на аналит.

Для реализации данного метода нужно приготовить один стандартный раствор – внешний стандарт, содержащий известное количество определяемого соединения. При этом необходимо обладать априорной информацией о содержании аналита в исследуемом образце, так как концентрация аналита во внешнем стандарте должно быть максимально близка концентрации аналита в исследуемой пробе.

В основе метода внешнего стандарта лежит прямо пропорциональная зависимость между содержанием аналита в исследуемой пробе и внешнем стандарте (1):

$$C_{\text{ст.}} \sim S_{\text{ст.}} \quad (1)$$

$$C_x \sim S_x$$

исходя из которой, концентрация аналита в исследуемой пробе выражается следующей формулой (2):

$$C_x = \frac{C_{\text{ст.}} \times S_x}{S_{\text{ст.}}}, \quad (2)$$

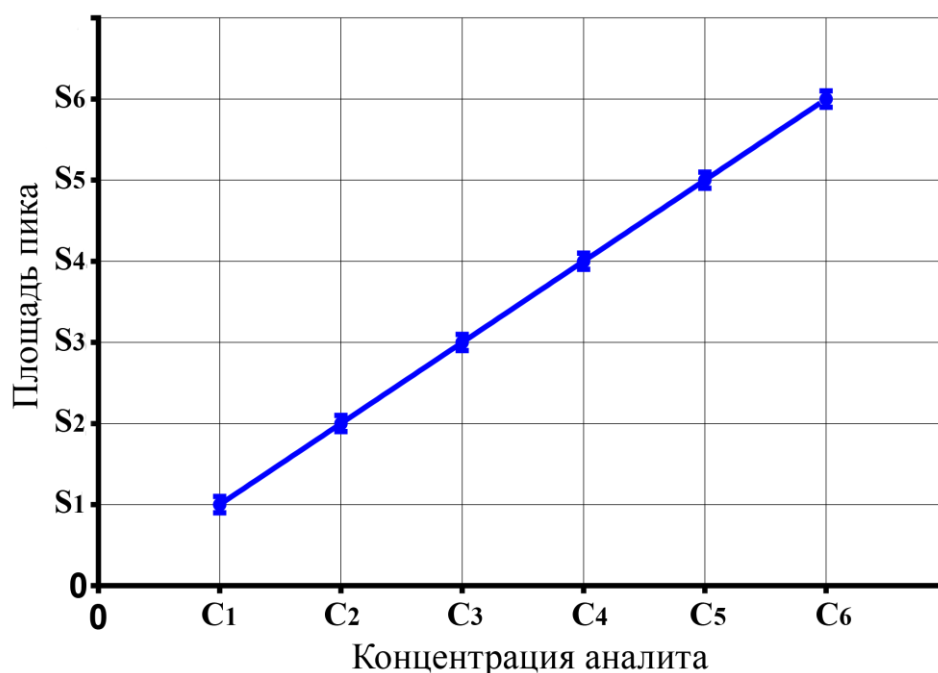
где  $C_x$  – концентрации аналита в исследуемой пробе;  $C_{\text{ст.}}$  – концентрация аналита в растворе внешнего стандарта;  $S_x$  и  $S_{\text{ст.}}$  – площади пика аналита, полученные в результате анализа исследуемой пробы и внешнего стандарта.

Среди недостатков метода внешнего стандарта можно отметить то, что на него в значительной степени влияют стабильность параметров хроматографической системы (температура колонки, состав и скорость подвижной фазы), постоянство объёма дозирования пробы и наличие загрязнений в образце. А кроме этого относительно невысокая точность получаемых результатов в сравнении с другими методами количественного анализа.

### **1.1.2. Метод абсолютной градуировки**

Метод абсолютной градуировки является наиболее распространённым методом определения концентрации аналита в исследуемых пробах. Он включает в себя подготовку серии (не менее трёх) стандартных растворов (внешних стандартов), содержащих известное количество вещества, представляющего интерес, и равномерно пе-

рекрывающих диапазон возможных его содержаний. Измерение отклика детектора на каждый стандартный раствор и установление взаимосвязи между откликом детектора (площадью или высотой пика) и содержанием аналита [2]. Полученное в результате этого математическое соотношение (уравнение регрессии) применимо для анализа однотипных образцов с неизвестным содержанием этих компонентов. Для большей наглядности экспериментальные данные и уравнение регрессии можно изобразить в виде градуировочного графика (рис. 2). На оси абсцисс такого графика откладывают концентрации аналита в каждом градуировочном растворе, а на оси ординат площадь пика аналита, соответствующую градуировочному раствору.



**Рисунок 2.** Градуировочный график, построенный по методу абсолютной градуировки

Регрессионные зависимости могут выражаться разными функциями, но для большинства детекторов используемых в хроматографии - линейными. Метод наименьших квадратов (МНК) [3,6] является наиболее распространённым способом вычисления параметров линейных регрессионных уравнений вида (3):

$$C = a \times S + b, \quad (3)$$

где  $C$  — концентрация аналита в пробе;  $S$  — площадь хроматографического пика аналита;  $a$  и  $b$  — параметры линейного уравнения, вычисленные с помощью МНК.



Чаще всего используют так называемый обычный метод наименьших квадратов (ordinary least squares, OLS). Цель метода - минимизировать сумму разностей квадратов между наблюдаемыми абсолютными значениями площадей пиков каждой градуировочной точки и значениями точек, предсказанными линейной аппроксимацией данных. Чем меньше эта сумма, тем лучше модель. Однако этот метод минимизирует абсолютные значения. Таким образом, относительная ошибка в области низких концентраций ( $C$ ) может быть неприемлемо высокой. Для подавления этой особенности OLS применяется регрессия взвешенных наименьших квадратов (weighted least squares, WLS) с различными весовыми коэффициентами ( $1/C$ ,  $1/C^2$ ,  $1/C^{0.5}$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ,  $1/y^{0.5}$ ), но наиболее эффективным считается коэффициент  $1/C^2$  [7,8]. WLS не может дать лучшие результаты, если выбрана неверная модель, например, когда линейная модель берется для аппроксимации нелинейных данных. Другим применением WLS является обработка данных с разной дисперсией [9], то есть когда дисперсия существенно меняется от одного градуировочного раствора к следующему, что часто встречается в хроматографии [3]. Обычно дисперсия увеличивается с концентрацией. Введение весового коэффициента учитывает неравную прецизионность площадей пиков, полученных при анализе разных растворов внешних стандартов.

Необходимо стремиться именно к линейной градуировочной зависимости, так в данном случае, как правило, выше точность получаемых результатов количественных определений и требуется меньше стандартных растворов для градуировки детектора [4]. Это объясняется тем, что в случае нелинейной градуировочной зависимости сложно подобрать подходящее регрессионное уравнение, точно соответствующее полученным экспериментальным данным.

Важнейшим требованием к эксперименту при выполнении количественного анализа по методу абсолютной градуировки, в независимости от вида регрессионного уравнения, является высокая прецизионность дозирования пробы, а также строгое постоянство хроматографического режима, как на стадии градуировки детектора, так и при определении целевого компонента в пробе неизвестного состава. Кроме этого, немало важно применять для градуировки образцы с известной концентрацией аналитов, которые по своему составу как можно ближе к составу анализируемых объектов. В противном случае может возникнуть систематическая ошибка, связанная с неадекватностью образцов для градуировки анализируемым образцам.

К достоинствам метода абсолютной градуировки относятся возможность контроля получаемых результатов, за счёт параметров характеризующих регрессионное уравнение, а также его высокая точность в условиях стабильности хроматографического режима и объёма дозируемых проб. Существенными недостатками метода абсолютной градуировки является необходимость построения градуировочных зависимостей для каждого интересующего нас компонента пробы, что требует много времени.

#### **1.1.2.1. Проверка соответствия регрессионного уравнения экспериментальным данным с помощью числовых параметров**

Функция регрессии наилучшим образом соответствующая экспериментальным данным, является только оценкой истинной функции. Это, в свою очередь, приводит к неопределенности в результатах количественного анализа, сделанных на основе данной градуировочной кривой.

Пригодность вида функции, выбранной для расчёта регрессионного уравнения, может быть оценена множеством параметров: графических, статистических и числовых. Среди них наиболее популярным является числовой параметр - коэффициент детерминации ( $R^2$ ).  $R^2$  является показателем доли дисперсии зависимой переменной (площади пика), объясняемой рассматриваемой регрессионной зависимостью и изменяется от 0 до 1 включительно. Необходимо, чтобы  $R^2$  был выше 0.96, в противном случае, следует выбрать другую градуировочную функцию [3]. Однако известно, что коэффициент детерминации может принимать высокие значения ( $> 0.9$ ) даже при отсутствии корреляции величин, особенно если речь идет о градуировке нелинейной функцией [10]. Поэтому к высоким значениям  $R^2$  следует относиться с осторожностью.

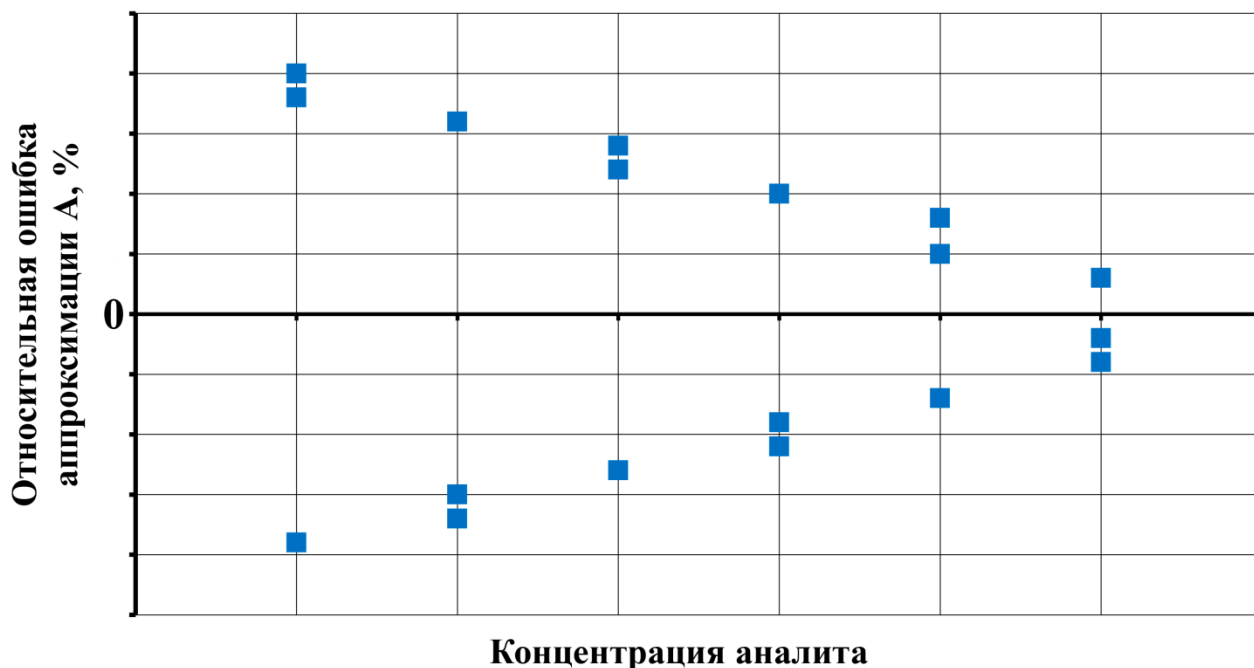
Куда более понятным и надёжным показателем того, правильно ли выбрана регрессионная функция и насколько хорошо она описывает экспериментальные данные, является относительная ошибка аппроксимации (A) [6,11,12], которая рассчитывается следующим образом (4):

$$A = \frac{(C_n - C_3)}{C_3} \times 100, \quad (4)$$

где  $C_3$  – заданная по приготовлению концентрация аналита в градуировочном растворе;  $C_n$  – концентрация аналита, найденная, исходя из градуировочного уравнения по площадям пиков, соответствующим раствору внешнего стандарта.

Таким образом,  $A$  показывает ошибку вычисления концентрации аналита в образце по найденному регрессионному уравнению, соответственно, чем ниже значение ошибки аппроксимации, тем точнее результаты количественного определения.

Зависимость относительной ошибки аппроксимации от концентрации аналита можно изобразить в виде графика (рис. 3), с помощью которого удобно оценить максимальное  $A$ , а также выяснить насколько велика ошибка аппроксимации при данной концентрации аналита.



**Рисунок 3.** График, изображающий типичное для инструментальных методов анализа распределение относительной ошибки аппроксимации в зависимости от концентрации аналита

Относительная ошибка аппроксимации позволяет сравнивать эффективность различных регрессионных функций. Это возможно либо по уменьшению её суммы для градуировочной функции ( $\sum |A_i|$ ), либо по нахождению максимальной ошибки аппроксимации  $A_{\max}$ , которая, обычно соответствует наименьшей концентрации, описываемой данным градуировочным уравнением (рис. 3). Значение  $A_{\max}$  регламентируется некоторыми организациями (US FDA [13], ANVISA [14], JRC-FCM [15], EMA [16]), оно не должно превышать 20 % для нижнего предела количественного определения и 15 % для остальной градуировочной функции.

### 1.1.3. Метод стандартной добавки

Принцип метода заключается в измерении аналитического сигнала целевого компонента до и после добавления известного количества анализируемого вещества к исследуемому образцу.

Метод стандартной добавки используют в случаях, когда аналит должен быть количественно определен в матрице, влияние которой может изменить форму и размер хроматографического пика аналита. В этом случае сам образец выступает в качестве калибровочной матрицы. Уникальной особенностью метода стандартной добавки является то, что он может быть использован для определения общего содержания целевых компонентов в гетерофазных системах на основе анализа только одной из фаз [17]. Это позволяет анализировать ту фазу, которая содержит меньшее количество мешающих веществ.

Неизвестное содержание аналита определяют по увеличению высоты или площади пика, происходящему в результате одной или нескольких добавок известного количества аналита к пробе.

Однократная добавка позволяет оперативно оценить содержание аналита в образце с матрицей мешающей количественному определению, используя для расчёта простую прямо пропорциональную зависимость (5):

$$m_x = \frac{m_{\text{добавки}} \cdot S_x}{S_{x+\text{добавка}} - S_x}, \quad (5)$$

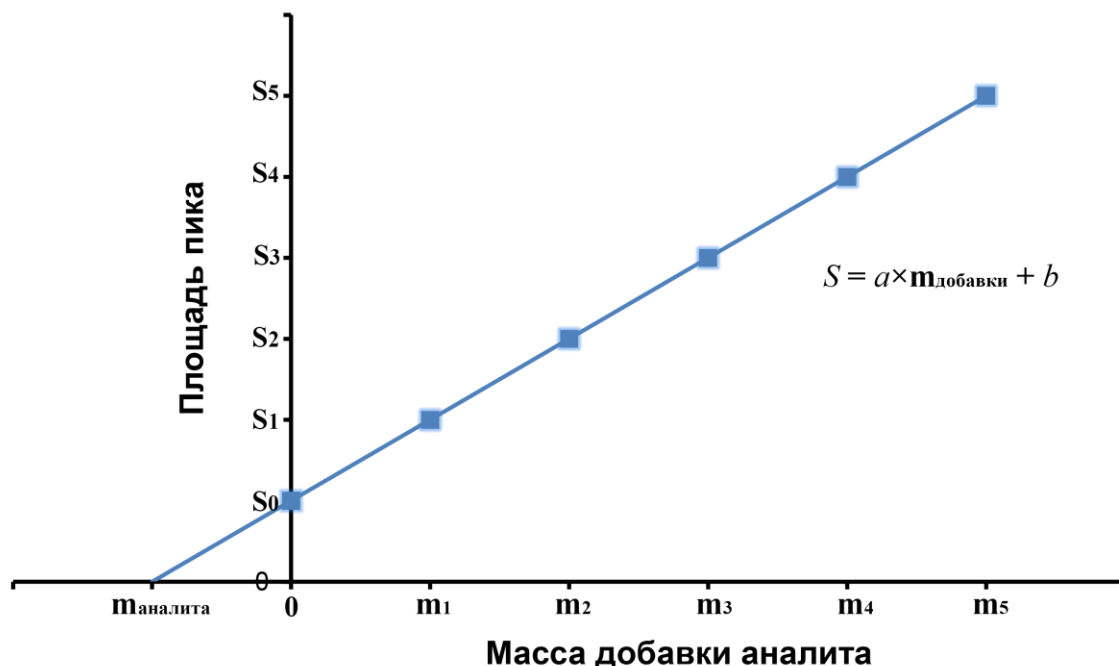
где  $m_x$  – масса аналита в исследуемом образце;  $m_{\text{добавки}}$  – масса аналита в добавке;  $S_x$  и  $S_{x+\text{добавка}}$  – площади пика аналита до и после добавки аналита соответственно.

В методе стандартной добавки содержание аналита удобнее выражать массой, так в случае использования концентраций необходим учёт разбавления пробы при добавке аналита.

### 1.1.4. Метод последовательных стандартных добавок

В случаях, требующих большей точности результатов количественного определения аналита в сложных матрицах (биологические среды, почва, сточные воды...), используют метод последовательных стандартных добавок [18].

В данном случае делают несколько последовательных добавок аналита в исследуемую пробу. После каждой добавки измеряют площадь хроматографического пика. Затем вычисляют параметры уравнения регрессии, используя для этого метод наименьших квадратов и подходящую аппроксимирующую функцию, по аналогии с методом абсолютной градуировки. Содержание аналита узнают экстраполяцией уравнения регрессии на нулевую добавку (рис. 4).



**Рисунок 4.** Пример, градуировочного графика, построенного по методу последовательных стандартных добавок.

Таким образом, для вычисления концентрации аналита используют выражения вида (6):

$$m_{\text{аналита}} = -\frac{b}{a}, \quad (6)$$

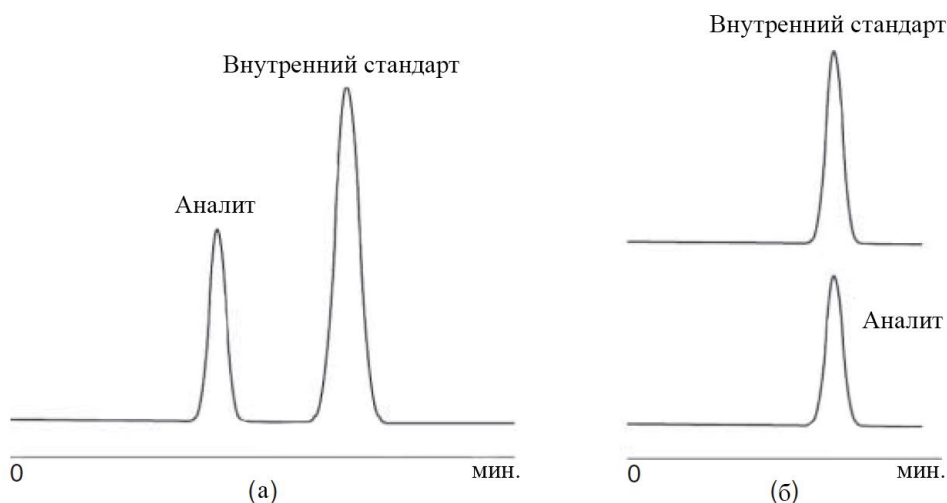
где  $a$  и  $b$  – параметры линейной градуировочной зависимости, вычисленные с помощью МНК.

Как и в случае с методами внешнего стандарта и абсолютной градуировки, точность метода стандартной добавки сильно зависит от стабильности хроматографического режима и повторяемости дозирования объема пробы в хроматографическую систему.

### 1.1.5. Метод внутреннего стандарта

Принцип метода заключается во введении в анализируемый образец точно известного количества стандартного вещества. В качестве стандартного выбирают вещество, максимально близкое по своим физико-химическим свойствам к целевому компоненту смеси. Это вещество должно отсутствовать в анализируемой смеси и давать пик на хроматограмме полностью отделённый от пиков других компонентов [18]. Часто бывает непросто подобрать такое вещество. В подобных случаях в качестве внутреннего стандарта применяют такие соединения, которые не встречаются в природе, например, фторсодержащие или изотопно-меченные гомологи аналита (рис. 5).

Идеальный внутренний стандарт, при использовании масс-спектрометрического детектора, представляет собой изотопно-меченую версию анализируемого вещества. Меченый внутренний стандарт по своим физико-химическим свойствам точно соответствует аналиту, но определяется при более высоком отношении массы к заряду ( $m/z$ ). При этом важно, чтобы значение  $m/z$  для внутреннего стандарта не мешало изотопным пикам анализируемого вещества. Меченые внутренние стандарты дороги и не всегда могут быть легкодоступны, поэтому в случаях низкого матричного влияния, в качестве внутреннего стандарта можно использовать гомологи, отличающиеся от аналита на один атом углерода.



**Рисунок 5.** Хроматограммы, показывающие использование внутренних стандартов. (а) Внутренний стандарт отделен от анализируемого вещества. (б) внутренний стандарт является изотопно-меченым аналитом, детектирование аналита и стандарта происходит масс-спектрометрически при различных значениях  $m/z$

Перед количественным анализом необходимо определить коэффициент чувствительности (отклика) детектора аналит/внутренний стандарт. Для этого необходимо приготовить стандартный раствор, содержащий известные количества аналита и внутреннего стандарта, проанализировать его и рассчитать коэффициент по следующей формуле (7):

$$f\left(\frac{x}{\text{вн.ст}}\right) = \frac{C_x \times S_{\text{вн.ст}}}{C_{\text{вн.ст}} \times S_x}, \quad (7)$$

где  $f\left(\frac{x}{\text{вн.ст}}\right)$  – коэффициент чувствительности детектора аналит/внутренний стандарт;  $C_x$ ,  $C_{\text{вн.ст}}$  – концентрации аналита и внутреннего стандарта в стандартном растворе соответственно;  $S_x$ ,  $S_{\text{вн.ст}}$  – площади пика аналита и внутреннего стандарта на хроматограмме стандартного раствора соответственно.

После того как коэффициент рассчитан, в хроматограф вводят исследуемый образец с внутренним стандартом и производят расчёт содержания аналита согласно формуле (8):

$$C_x = \frac{C_{\text{вн.ст}} \times S_x}{S_{\text{вн.ст}}} \times f\left(\frac{x}{\text{вн.ст}}\right), \quad (8)$$

где  $C_x$  – концентрации аналита в исследуемом образце;  $C_{\text{вн.ст}}$  – концентрация внутреннего стандарта в исследуемом образце;  $S_x$ ,  $S_{\text{вн.ст}}$  – площади пика аналита и внутреннего стандарта на хроматограмме исследуемого образца соответственно.  $f\left(\frac{x}{\text{вн.ст}}\right)$  – коэффициент чувствительности детектора аналит/внутренний стандарт;

Преимуществом метода внутреннего стандарта является то, что он в значительной мере лишён влияния потерь аналита на стадии пробоподготовки, нестабильности хроматографического режима и прецизионности дозирования пробы в хроматографическую систему. Применение внутреннего стандарта уменьшает трудоемкость измерений в случае групповых определений, когда измеряют концентрацию большого числа целевых соединений одновременно. Кроме этого, метод не требует наличия стандартного раствора аналита, что важно, когда целевого компонента мало или он дорогой.

Именно поэтому данный метод количественного анализа относится к числу чаще всего рекомендуемых для контроля содержания действующих веществ лекарственных препаратов в биологических жидкостях [19].

### 1.1.6. Метод двойного внутреннего стандарта

Метод двойного внутреннего стандарта один из наиболее точных способов определения содержания целевых компонентов в любых матрицах при использовании различных способов подготовки проб и, следовательно, при любых уровнях потерь определяемых соединений на этой стадии [20]. Метод, заключается в том, что в исследуемый образец вводят два (а в общем случае и более) стандартных вещества (внутренних стандарта), элюирующихся до и после целевого компонента. В качестве стандартных веществ выбирают предыдущий и последующий гомологи целевого компонента. То есть если в молекуле аналита число атомов углерода равно  $n$ , то в стандартах это число равно  $n-1$  и  $n+1$ . Такой выбор стандартов обусловлен тем, что нет необходимости предварительного определения коэффициентов относительной чувствительности  $f\left(\frac{x}{\text{вн.ст.}}\right)$ , так как их гомологические вариации взаимно компенсируются.

Содержание целевого компонента в пробе вычисляют по формуле (9):

$$m_x = S_x \times \sqrt{\frac{m_{\text{ст.}(n-1)}}{S_{\text{ст.}(n-1)}} \times \frac{m_{\text{ст.}(n+1)}}{S_{\text{ст.}(n+1)}}}, \quad (9)$$

где  $m_x$  - масса аналита в исследуемом образце;  $m_{\text{ст.}(n-1)}$  и  $m_{\text{ст.}(n+1)}$  - масса добавок гомологов аналита  $n-1$  и  $n+1$  соответственно;  $S_x$ ,  $S_{\text{ст.}(n-1)}$ ,  $S_{\text{ст.}(n+1)}$  - площади пиков аналита и его гомологов  $n-1$  и  $n+1$  соответственно.

Существенным недостатком метода двойного внутреннего стандарта является необходимость иметь в наличии два гомолога аналита, которые бывает сложно найти для некоторых аналитов.

### 1.1.7. Метод внутренней нормализации

Метод внутренней нормализации подразумевает, что пики всех компонентов исследуемой смеси зафиксированы на хроматограмме, и сумма их количественных параметров (площадей или высот) равна 100%. Таким образом, отношение площади пика отдельного компонента к сумме площадей всех зарегистрированных пиков характеризует относительную долю (% по массе, объёму или молярности) компонента в смеси (рис. 6) [21]. Однако из-за различия в чувствительности детектора к разным компонентам пробы необходим расчёт коэффициентов чувствительности для каждого компонента или группы соединений-гомологов по отношению, к выбранному стан-

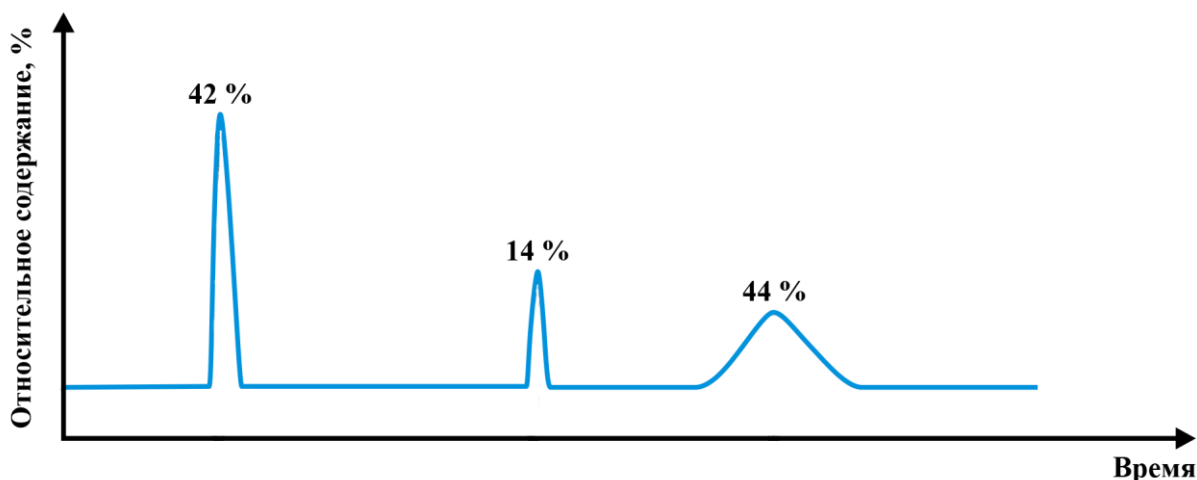


дартному соединению, аналогично тому, как это делается в методе внутреннего стандарта.

Расчёт относительного содержания компонента в анализируемом образце осуществляется с помощью формулы (10).

$$C_x(\%) = \frac{S_x \times f_x}{\sum_1^n S_i \times f_i} \times 100, \quad (10)$$

где  $S_x$  – площадь пика аналита,  $S_i$  – площадь пика  $i$ -го соединения;  $f_x$  – коэффициенты чувствительности детектора для аналита  $i$ -го соединения.



**Рисунок 6.** Пример обработки хроматограммы методом внутренней нормализации

Достоинствами метода внутренней нормализации являются отсутствие необходимости точного дозирования образца, а также то, что из одной хроматограммы исследуемой смеси мы узнаём относительное содержание всех её компонентов. Именно поэтому метод внутренней нормализации идеально подходит для быстрого потокового анализа сложных смесей, например нефти и газа или контроля качества лекарственных препаратов.

Однако у этого метода есть недостатки. Выбранный хроматографический режим должен обеспечивать полное отделение всех входящих в смесь соединений друг от друга. Кроме этого необходимо знать априорную информацию о соединениях входящих в состав анализируемой пробы для того чтобы рассчитать коэффициенты чувствительности ( $f_i$ ) компонентов.

## 1.2 Выводы из литературного обзора

Рассмотрев представленные в литературе методы количественного анализа, можно заключить, что на данный момент не существует единого универсального метода, позволяющего узнать содержание аналита в образце с наименьшими трудозатратами и наибольшей точностью. Это подтверждают данные табл. 1, в которой представлены достоинства и недостатки всех описанных выше методов количественного анализа.

**Таблица 1.** Методы количественного анализа и их достоинства и недостатки

Метод анализа	Достоинства	Недостатки
Внешнего стандарта	Прост, быстр	Относительно невысокая точность; зависит постоянства условий анализа и объёма вводимой пробы
Абсолютной градуировки	Высокая точность	Долгий; зависит постоянства условий анализа и объёма вводимой пробы
Стандартной добавки	Быстр; анализ в условиях матричного влияния пробы	Относительно невысокая точность; зависит постоянства условий анализа и объёма вводимой пробы
Последовательных стандартных добавок	Высокая точность; анализ в условиях матричного влияния пробы	Долгий; зависит постоянства условий анализа и объёма вводимой пробы; градуировочную зависимость необходимо строить для каждой анализируемой пробы
Внутреннего стандарта	В значительной степени не зависит от постоянства условий анализа и объёма вводимой пробы	Необходим расчёт коэффициента чувствительности детектора аналит/внутренний стандарт

Двойного внутреннего стандарта	Анализ при потерях аналита в результате пробоподготовки	Внутренние стандарты не всегда доступны
Внутренней нормализации	Одновременное определение содержания всех компонентов пробы; не зависит от объёма вводимой пробы	Подбор условий для регистрации и полного разделения всех компонентов пробы; необходим расчёт коэффициента чувствительности детектора аналит/внутренний стандарт для всех компонентов пробы; даёт только относительное содержание

Вследствие этого, целью представленной далее работы является совершенствование, а именно, увеличение прецизионности результатов количественного анализа, методами, результаты количественных определений которых подвержены влиянию постоянства условий анализа и объёма вводимой пробы: внешнего стандарта, абсолютной градуировки и стандартной добавки.

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Приборы и реактивы

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Ресурсный Образовательный Центр по направлению химия», а также отечественной и зарубежной серийно выпускаемой химико-аналитической аппаратуры и средств измерений.

Работа выполнялась с использованием трёх методов анализа: 1) газовой хроматографии (ГХ); 2) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и 3) капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ).

1) Анализ методом газовой хроматографии осуществлялся на газовых хроматографах «Хроматэк-Кристалл 5000.2» (Хроматэк) с пламенно-ионизационным детектированием (ПИД). В качестве газа-носителя выступал азот, производимый генератором азота «ГЧА-18» (НПП Химэлектроника). Питание детектора воздухом и водородом осуществляли с помощью воздушного компрессора и генератора водорода соответственно (Хроматэк). Все газы, поступающие в хроматографы, дополнительно очищали на каталитическом фильтре (Фильтр 10.0). Разделение компонентов проб осуществляли на капиллярных колонках, характеристики которых приведены в табл. 2.

**Таблица 2.** Используемые в работе капиллярные газохроматографические колонки.

Колонка (Производитель)	Неподвижная фаза	Размеры (длина × внутренний диаметр × толщина плёнки неподвижной фазы)
BPX1 (SGE Analytical Science)	100 % диметилполисилоксан	10 м × 0.53 мм × 2.65 мкм
CP-Sil 8 CB (Agilent J&W)	5 % фенильных групп в диметилполисилоксане	30 м × 0.53 мм × 5 мкм
OPTIMA-1 (Macherey-Nagel)	100 % диметилполисилоксан	25 м × 0.32 мм × 0.35 мкм

2) Анализ методом (ВЭЖХ) осуществляли на хроматографической системе «Стайер» (Аквилон), в состав которой входили два насоса высокого давления, дина-

мический смеситель, термостат колонки, система дегазации подвижной фазы и спектрофотометрический детектор. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил/вода (+1 % трифторуксусной кислоты). Разделение компонентов пробы происходило на стальной колонке заполненной октадецилсиликагелем «Luna C18» (Phenomenex), длиной 150 мм, внутренним диаметром 3 мм и средним диаметром частиц 3 мкм.

3) Анализ методом капиллярного электрофореза осуществляли на системе капиллярного электрофореза «Капель 105М» (Люмэкс) со спектрофотометрическим детектированием. Разделение компонентов пробы осуществлялось на кварцевом капилляре длиной 60 см, внутренним диаметром 50 мкм.

Для управления газовыми хроматографами и расчёта площадей хроматографических пиков применяли программное обеспечение «Хроматэк-Аналитик 2.6». Управление жидкостным хроматографом осуществляли с помощью программного комплекса «Мультихром 1.5» (Амперсенд). Систему капиллярного электрофореза контролировали через программу «Эльфоран».

Режим анализа подбирался индивидуально для каждой модельной смеси с целью наилучшего разделения её компонентов.

Ввод пробы в жидкостный хроматограф производили с помощью петли объёмом 10 мкл, а в газовые хроматографы с помощью микрошприцев объёмом 1 мкл: «МШ-1М» (Цвет) и «Газохром 101» (Лабораторные Технологии), а кроме этого шприцем объёмом 10 мкл (SGE Analytical Science)

Для приготовления модельных смесей использовали механические дозаторы переменного объёма «Biohit Proline Plus» (10 - 100 мкл, 100 - 1000 мкл и 1 - 10 мл), а также электронный шприц «eVol XR» (SGE Analytical Science) со сменными иглами различного объёма (5, 50, 100, 500 и 1000 мкл). Взвешивание твердых веществ производили на аналитических весах «Shimadzu AUX» (цена деления 0,1 мг).

Для приготовления модельных растворов использовали вещества, представленные в табл. 3.

**Таблица 3.** Используемые в работе вещества и реагенты:

Вещества	Производитель	Чистота
Азот	Генератор азота «ГЧА-18» (НПП Химэлектроника)	Особой чистоты
Воздух	Компрессор (Хроматэк)	Особой чистоты (для питания ПИД)
Водород	Генератор водорода (Хроматэк)	ОСЧ (для питания ПИД)
Вода деионизованная	Деионизатор Д-301 (Аквилон)	Удельное сопротивление $\geq 18$ МОм×см
Ацетонитрил	Криохром	ОСЧ, сорт О
Трихлорметан	Вектон	ХЧ
Дихлорметан	ЛенРеактив	ХЧ
Бутан-1-ол	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Пропан-2-ол	Вектон	ХЧ
Октан	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Изопропил-п-ксилол (1,4-диметил-2- (1-метилэтил) бензол )	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Хлорбензол	Реахим	ХЧ, для хроматографии
о-Ксилол (1,2-диметилбензол)	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Псевдокумол (1,2,4-триметилбензол)	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Изопентанол (3-метилбутан-1-ол)	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Гексан-1-ол	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Анизол (метилфениловый эфир)	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Бутирофенон (1-фенилбутан-1-он)	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Нитробензол	Вектон	Ч
Бутилэтанوات	Реахим	ХЧ, для хроматографии

Изопропилбутаноат	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Бутилбутаноат	Реахим	ХЧ, для хроматографии
Ацетофенон (фенилэтанон)	ЛенРеактив	ХЧ, для хроматографии
Бензойная кислота	Вектон	ЧДА
п-Метилбензойная кислота	Вектон	Ч

Статистическую обработку данных и построение графиков производили в «OriginPro 2015» (OriginLab), «GraphPad Prism 6» (GraphPad Software), «Excel 2010» (Microsoft Office) и Statgraphics Centurion XVII (Statgraphics).

## 2.2. Приготовление модельных растворов

Модельные растворы готовили объёмно – объёмным (для жидких компонентов) и массо – объёмным (для твердых компонентов) способами.

Для приготовления объёмно – объёмным способом точно измеренный объём каждого соединения дозировали в известный объём растворителя. При этом расчёт концентраций соединений производили в массо – объёмных единицах (мкг/мл) по формуле (11).

$$C_K = \frac{V_K \times \rho_K \times 1000}{V_{\text{общ.}}}, \quad (11)$$

где  $C_K$  – концентрация компонента в растворе (мкг/мл);  $V_K$  – объём компонента, добавленный в модельный раствор (мл);  $\rho_K$  – плотность чистого компонента (г/см<sup>3</sup>);  $V_{\text{общ.}}$  – суммарный объём раствора (мл).

Для приготовления модельных растворов массо – объёмным способом брали точную навеску соединения на аналитических весах, переносили её в мерную колбу и доводили до метки требуемым растворителем. После этого, для полного растворения навески, колбу помещали в ультразвуковую ванну на 20 минут при 50 °С. Расчёт концентрации соединения осуществляли по формуле (12):

$$C_K = \frac{m_H \times 10^6}{V_{\text{м.к}}} \quad (12)$$

где  $m_H$  – масса навески соединения;  $V_{\text{м.к}}$  – объём мерной колбы, мл.

### 2.3. Обработка результатов измерений и оценка их погрешности

Для каждой хроматограммы модельной смеси рассчитывали количественные параметры пиков (площади и высоты) её компонентов с помощью программного обеспечения аналитического прибора. Для серии хроматограмм модельной смеси вычисляли среднее значение, среднеквадратическое отклонение (СКО), случайную погрешность анализа и её относительное значение (коэффициента вариации) для количественных параметров пиков каждого компонента.

Расчёт среднего значения производили по формуле (13):

$$x_{\text{cp}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (13)$$

где  $x_{\text{cp}}$  – среднее арифметическое значение результатов измерений;  $x_i$  –  $i$  результат измерения;  $n$  – число измерений.

Среднеквадратичное отклонение (стандартное отклонение) рассчитывали по формуле (14):

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{\text{cp}})^2}{n-1}}, \quad (14)$$

где  $S_x$  – среднеквадратичное отклонение измеренной величины в серии измерений.

Случайную составляющую погрешности результата измерений оценивали по формуле (15):

$$\Delta X = \frac{t_{k,f} * S_x}{\sqrt{n}}, \quad (15)$$

где  $\Delta X$  - случайная погрешность,  $t_{k,f}$  - коэффициент Стьюдента,

Относительное значение случайной погрешности  $\Delta X_{\text{отн}}$  и относительное значение среднеквадратичного отклонения  $S_{\text{отн}}$  вычисляли по формулам (16):

$$\Delta X_{\text{отн}} = \frac{\Delta X}{x_{\text{cp}}} * 100\% ; S_{\text{отн}} = \frac{S_x}{x_{\text{cp}}} * 100\% \quad (16)$$



### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Выявление потерь проб на стадии их дозирования при помощи построения гистограмм

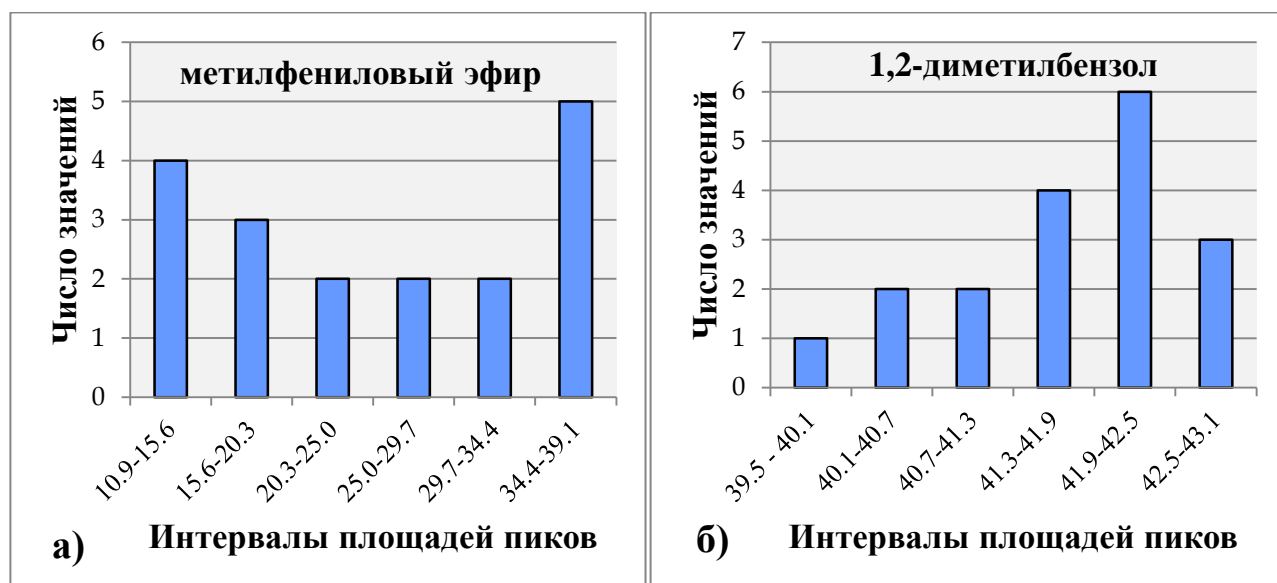
Основными источниками низкой точности (правильности и повторяемости) количественного хроматографического анализа методами внешнего стандарта, абсолютной градуировки и стандартной добавки, основанных на непосредственном использовании абсолютных количественных параметров (площадей и высот) целевых компонентов, являются нестабильность режима хроматографического анализа и трудно учитываемые потери проб при их дозировании в хроматографическую колонку. Наиболее существенно потери проб влияют в газовой хроматографии, причину таких потерь бывает крайне сложно идентифицировать, чаще всего она связана с износом элементов дозирующих устройств (микрошприцев). Обычно рекомендуемое применение автоматических дозаторов в таких условиях [22] не может обеспечить необходимую повторяемость дозирования образцов, так как такие дозаторы, несомненно, гарантируют постоянное время нахождения шприцев в нагретых зонах испарителей, но не оказывают влияния на потери проб в самих шприцах.

Для характеристики проблем, возникающих в результате неконтролируемых потерь анализируемых образцов во время их дозирования в хроматограф, целесообразно рассмотреть данные табл. 4. В таблице приведены значения площадей пиков, измеренные для образцов, последовательно дозируемых с использованием недостаточно герметичного, после длительного использования шприца (раздел таблицы «низкая повторяемость»), и ранее не использовавшегося шприца (раздел «нормальная повторяемость»). Обычная статистическая обработка этих данных с вычислением средних значений и их стандартных отклонений показывает, что коэффициент вариации, в случае дозирования изношенным шприцем в этом примере достигает 37 %, что неприемлемо. Исключение части результатов как возможных выбросов, в данном случае, нерационально, так как большинство критериев базируется на предположении о нормальности распределения [23,24], а в данном случае оно не выполняется. В связи с этим представляет интерес, каким еще способом кроме вычисления отношений максимального и минимального значений можно охарактеризовать полученные выборки площадей пиков ( $S_i$ ), с целью выявления частичных потерь проб при их дозировании.

Информативным и наглядным представлялось построение гистограмм, характеризующих распределение значений площадей пиков в диапазоне их вариаций (рис. 7).

**Таблица 4.** Пример выборок площадей пиков, полученных при дозировании образцов модельных смесей в условиях различной повторяемости

Соединение	Значения $S_i$	Среднее значение	Стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение, %
<b>Низкая повторяемость</b>				
метилфениловый эфир	10930; 11212; 14322; 14575; 17519; 19204; 19406; 21075; 22896; 25175; 28495; 30576; 33314; 34767; 34868; 35372; 35575; 38396	24871	9252	37
<b>Нормальная повторяемость</b>				
1,2-диметилбензол	39523; 40256; 40661; 40832; 40902; 41508; 41609; 41641; 41780; 42082; 42155; 42224; 42294; 42306; 42427; 42843; 42958; 42978	41721	962	2



**Рисунок 7.** Гистограммы, характеризующие распределение площадей пиков

**а)** Низкая повторяемость дозирования **б)** Нормальная повторяемость дозирования

Из таких гистограмм следует, что в случае низкой повторяемости дозирования интервалы, соответствующие наибольшим значениям  $S_i$ , содержат наибольшее число

значений по сравнению с другими интервалами, «заселенность» которых по мере уменьшения площадей более или менее равномерно уменьшается, что обусловлено именно неконтролируемыми потерями проб при дозировании. При «нормальной» повторяемости площадей пиков также есть небольшая асимметрия распределения. Главное же, что максимальное число значений  $S_i$  попадает не в участок гистограммы, соответствующий наибольшим величинам, а в следующий за ним, т.е. распределение в целом становится более симметричным. Таким образом, для выявления неконтролируемых потерь проб анализируемых образцов при дозировании можно рекомендовать построение гистограмм распределения площадей пиков. Однако такой способ требует параллельного дозирования образцов не менее 20 раз, следовательно, не слишком рационален для практических целей. Кроме того, он позволяет выявлять такие потери, но не компенсировать их.

### **3.2. Общая характеристика дополнительного стандарта**

#### **3.2.1. Дополнительный стандарт. Определение. Сравнение с внутренним стандартом**

Цель нашей работы – предложить способ увеличения прецизионности измерения количественных хроматографических параметров ( $S$  и  $h$ ) в случаях, когда не удаётся достигнуть требуемого уровня случайной погрешности анализа. Для этого вместо абсолютных количественных параметров пиков (площадей) мы предлагаем использовать относительные величины – отношения площадей пиков целевых компонентов к площадям пиков дополнительного стандарта.

*Дополнительный стандарт* – соединение, использующееся для вычисления *относительных параметров* хроматографических пиков аналитов, то есть отношений площадей пиков аналит/дополнительный стандарт.

Термин «дополнительный стандарт» вводится впервые. На первый взгляд можно заключить, что мы подменяем уже устоявшийся в количественном анализе термин «внутренний стандарт», использующийся в одноимённом методе, однако это абсолютно не так. Для того чтобы чётко разграничить предлагаемый нами дополнительный стандарт и внутренний стандарт необходимо ознакомиться с требованиями предъявляемыми к этим стандартам, которые указаны в табл.5.

**Таблица 5.** Сравнительная характеристика внутреннего и дополнительного стандартов

Критерий сравнения	Внутренний стандарт	Дополнительный стандарт
<i>Характеристика стандарта</i>		
Растворимость в образце	Да	Да
Стабильность в условиях хроматографического разделения и инертность в отношении других компонентов	Да	Да
Физико-химические свойства	Максимально соответствуют свойствам аналита. (Оптимальный вариант – изотопно-меченый аналит)	<b>Любые детектируемые соединения</b>
Присутствие в анализируемом образце	Отсутствует	<b>Может присутствовать</b>
Положение пика на хроматограмме	Максимально близко к пику аналита при условии полного разделения	<b>Нет ограничений</b>
<i>Характеристика процедуры анализа</i>		
Содержание в образце	Известно. Сравнимо с содержанием аналита	<b>Может быть неизвестным</b>
Необходимо ли определение относительного коэффициента отклика детектора?	Да	<b>Нет</b>

Можно видеть, что оба стандарта должны быть растворимы в образце и не вступать в реакции с другими соединениями, присутствующими в анализируемом образце. На этом сходства заканчиваются. К внутреннему стандарту предъявляется несколько требований, требующих его вдумчивого выбора. Наиболее важное среди них, максимальное соответствие физико-химическим свойствам целевого компонента, кроме этого стандарт должен отсутствовать в анализируемой пробе, а разница в параметрах удерживания с аналитом должна быть минимальна. При этом на химические свойства дополнительного стандарта нет никаких ограничений, а требуется лишь возможность его детектирования и хроматографическое разделение с

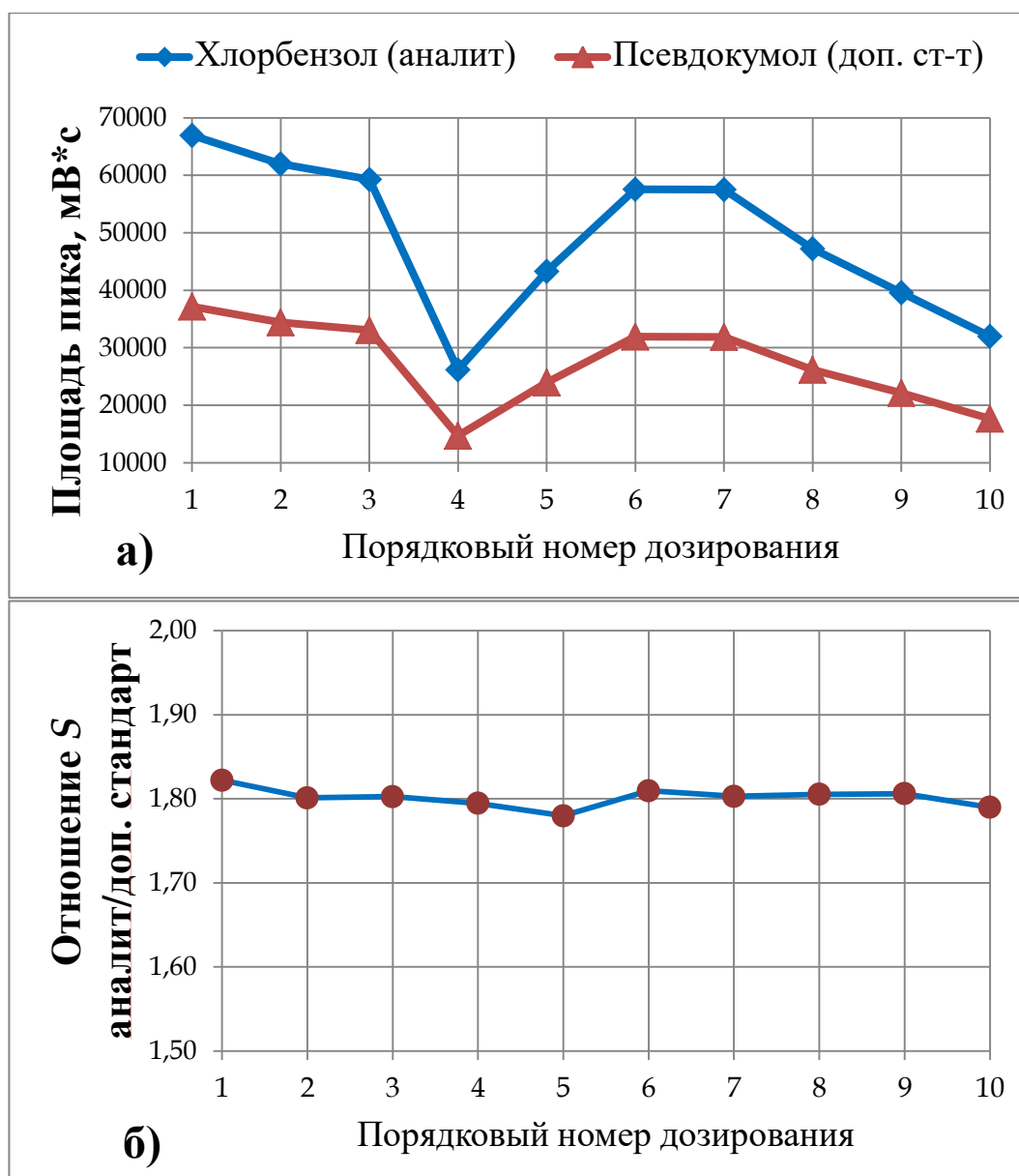
аналитом. Выполнение этого условия не требует экспериментальных операций, так как это можно сделать, пользуясь справочными значениями газохроматографических индексов удерживания [25]. Ещё более интересным является тот факт, что в качестве дополнительного стандарта можно выбирать растворитель пробы [26].

### **3.2.2. Относительные параметры аналит/дополнительный стандарт**

Представим себе, что мы вводим в хроматограф некоторую пробу, однако по тем или иным причинам не вся она детектируется. В результате этого разброс площадей пиков целевого компонента оказывается высоким. Теперь мы вводим в пробу дополнительный стандарт (стандарт уже может находиться в пробе). Потери пробы не исчезают, а хроматографический режим не становится стабильнее, но дополнительный стандарт теряется в той же степени, что и аналит, то есть дозируемые количества варьируют симбатно. Таким образом, если мы рассматриваем отношение аналит/дополнительный стандарт (относительный параметр), то оно будет значительно более стабильным независимо от потерь пробы.

Для иллюстрации этого рассмотрим графики, представленные на рис. 8. На графике *а)* изображена зависимость абсолютных площадей пиков хлорбензола (аналит) и псевдокумола (дополнительный стандарт) в зависимости от порядкового номера дозирования образца в испаритель газового хроматографа. В данном случае очевидны потери пробы на стадии её дозирования, так как площади пиков аналита и стандарта варьируют в диапазоне от 10 до 70 тысяч мВ\*с, а контуры линий соединяющих экспериментальные значения площадей пиков аналита и стандарта практически идентичны. График *б)*, изображающий зависимость отношения площадей хлорбензол/псевдокумол от порядкового номера дозирования пробы свидетельствует о том, что относительный параметр гораздо стабильнее в сравнении с абсолютными площадями пиков.

Лучшую повторяемость относительного параметра подтверждают и числа. В табл. 6. приведены числовые характеристики графиков, представленных на рис. 8. В таблице есть значения площадей пиков хлорбензола, псевдокумола и их отношения, а кроме этого относительная случайная погрешность абсолютных площадей хлорбензола и псевдокумола и соответствующего им относительного параметра.



**Рисунок 8.** Стабильность абсолютных площадей пиков и относительных параметров, полученных при анализе модельной смеси, в зависимости от порядкового номера её дозирования. **а)** Абсолютные площади пиков аналита и дополнительного стандарта. **б)** Относительные параметры, отношения площадей пиков аналит/дополнительный стандарт

Коэффициенты вариации площадей аналита и дополнительного стандарта в данном примере много выше, чем обычные характеристики повторяемости площадей пиков в газовой хроматографии (~3–5%), таким образом, по этим экспериментальным данным нельзя выполнять количественный анализ во избежание неверных

результатов. Однако коэффициент вариации относительного параметра составил всего 0.5 %, что является превосходным показателем повторяемости.

Рассчитав отношение коэффициентов вариации для аналита и относительного параметра получаем число, обозначающее во сколько раз уменьшилась «неопределённость» результатов при замене абсолютных площадей относительными параметрами. В данном случае повторяемость результатов увеличилась более чем в 50 раз.

**Таблица 6.** Сравнение коэффициентов вариации абсолютных площадей и относительного параметра, полученных в результате анализа модельной смеси

	Значения $S_i$ или $\frac{S_{\text{хлорбензол}}}{S_{\text{псевдокумол}}}$	Коэффициент вариации, %	Выигрыш в неопределенности и результатов $\left(\frac{\delta_1}{\delta_2}\right)$ , раз
Хлорбензол	66942; 61982; 59298; 26176; 43299; 57579; 57509; 4724; 39582; 31981	25.0 ( $\delta_1$ )	<b>50.2</b>
Псевдокумол	37167; 34385; 33044; 14709; 23929; 31937; 31855; 26161; 22115; 17660	24.9	
Относительный параметр	1.80; 1.80; 1.79; 1.78; 1.81; 1.80; 1.81; 1.81; 1.79; 1.81	0.5 ( $\delta_2$ )	

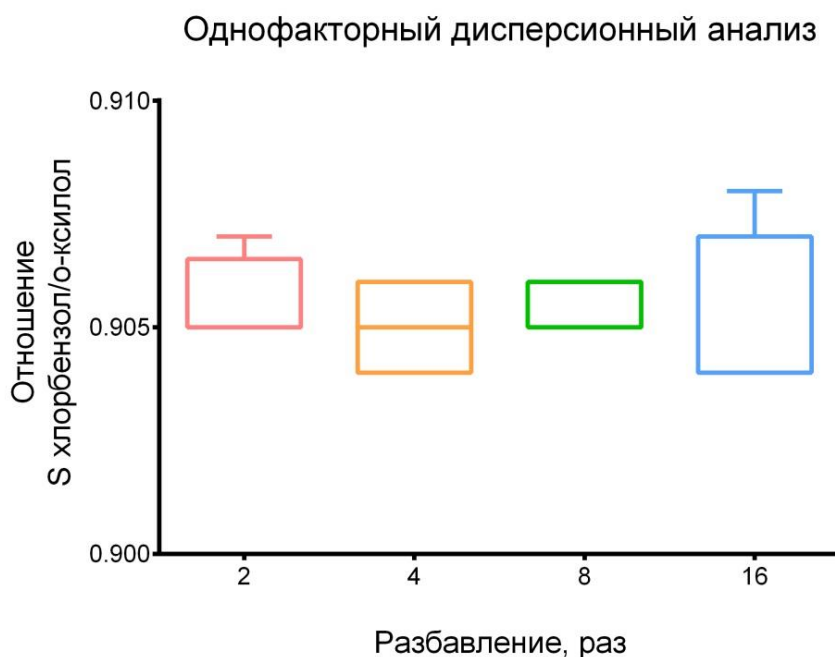
Из всего выше сказанного можно заключить, что используя вместо абсолютных площадей пиков хлорбензола относительный параметр, у нас не только появляется возможность проведения количественного анализа, но его случайная погрешность будет ниже, чем в случае обычной для газовой хроматографии повторяемости площадей пиков.

### 3.2.3. Стабильность относительных параметров в условиях разбавления пробы и варьировании её объёма при вводе в хроматографическую систему

Для того чтобы подтвердить высокое постоянство относительных параметров было проведено две серии экспериментов. В первом исходную пробу последовательно разбавляли несколько раз, а затем сравнивались средние значения относительных параметров. Во втором варьировали объём вводимой в испаритель ГХ пробы и также соотносили средние значения относительных параметров.

Для эксперимента с разбавлением пробы была приготовлена модельная смесь, состоящая из хлорбензола и о-ксилола с примерно равным содержанием (21.3 и 16.9 мг/мл). После этого модельную смесь последовательно разбавляли для того чтобы получить растворы с концентрацией компонентов меньше в 2, 4, 8 и 16 раз. Каждый раствор анализировали (ГХ) пять раз, и рассчитывали отношение площадей хлорбензол/о-ксилол (*приложение А*). Постоянство относительных параметров оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANalysis Of VAriance - ANOVA), позволяющего выявить статистически значимую разницу между средними значениями более двух исследуемых групп данных.

На рис. 9 представлен график типа «ящик с усами» иллюстрирующий распределение относительных параметров. Можно видеть, что «ящики» очень компактно распределены. Это подтверждают и числовые данные. Значение F-критерия (0.05, 3, 16) составило 0.25, что значительно ниже критического значения 3.24, при этом значение Р составило 0.86, что значительно больше 0.05.



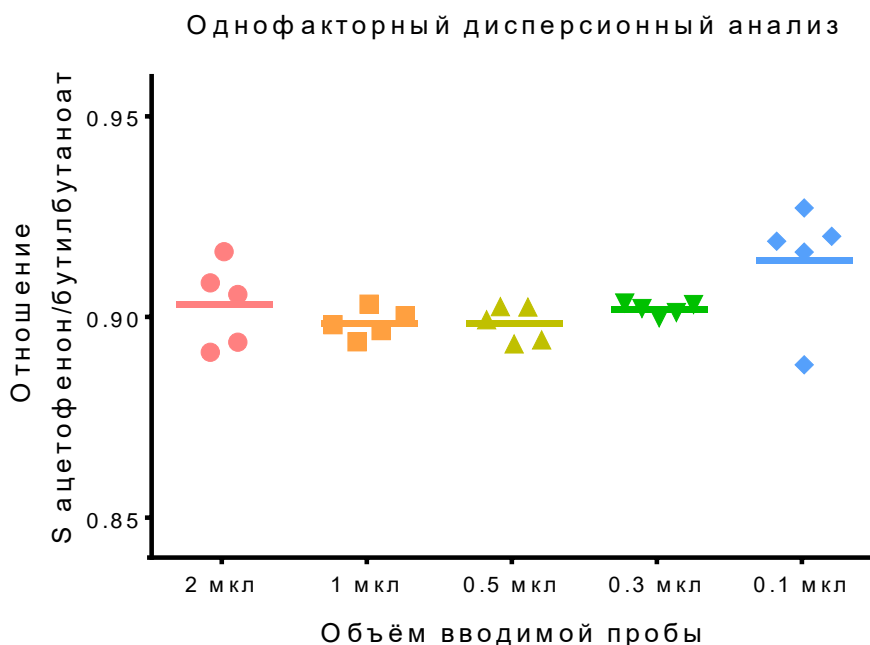
**Рисунок 9.** График «ящик с усами», иллюстрирующий распределение среднего значения относительных параметров для растворов с различной степенью разбавления

Таким образом, нулевая гипотеза о том, что нет статистической разницы между средними значениями относительных параметров четырех растворов, различной сте-



пени разбавления, на уровне значимости в 5% является верной. Это подтверждает высокую стабильность относительных параметров в условиях разбавления пробы.

Помимо этого было проверено постоянство относительных параметров при изменении объёма вводимой пробы. Для этого была приготовлена модельная смесь, состоящая из ацетофенона и бутилбутаноата в гексане. Объём вводимой смеси варьировали от 2 мкл до 0.1 мкл, каждый объём вводили в испаритель ГХ 5 раз (экспериментальные данные в *приложении Б*). После этого были рассчитаны отношения площадей ацетофенон/бутилбутаноат и проведено сравнение их средних значений между выборками посредством однофакторного дисперсионного анализа (рис. 10) аналогично тому, как это было сделано ранее.



**Рисунок 10.** График, иллюстрирующий изменение значения относительного параметра в зависимости от объёма вводимой пробы

Величина критерия Фишера (0.05, 4, 20) составила 2.80, что совсем немного меньше критического значения  $F_{кр.(0.05, 4, 20)} = 2.87$ . Тем не менее, с вероятностью в 95% нет статически значимой разницы между средними значениями относительного параметра, полученных при варьировании объёма пробы, вводимой в инжектор хроматографа.

Приведённые выше эксперименты подтверждают, что отношения площадей пиков аналит/дополнительный стандарт подвержены очень малым вариациям при любой повторяемости дозирования проб и выглядят крайне привлекательной заменой

абсолютных площадей в тех случаях, когда предоставляемая «традиционными методами количественного анализа случайная погрешность неприемлемо высока.

### 3.3. Модификация методов количественного анализа за счет использования дополнительного стандарта

#### 3.3.1. Метод внешнего стандарта

Для реализации модифицированного метода внешнего стандарта (с использованием относительных параметров) необходимо обеспечить приблизительно равные концентрации дополнительного стандарта в градуировочном растворе и анализируемом образце. Это условие достигается очень просто, необходимо лишь добавить равный объём дополнительного стандарта или его раствора к равным объёмам градуировочного стандарта и образца.

Применение вместо абсолютных площадей пиков их отношений к площадям пиков дополнительного стандарта закономерно влечёт за собой модификацию расчётных соотношений. Так модифицированное расчётное уравнение метода внешнего стандарта выглядит следующим образом (17):

$$C_x = \frac{C_{ст} \times \left( \frac{S_x}{S_{доп.ст.}} \right)}{\left( \frac{S_{ст}}{S_{доп.ст.}} \right)} \quad (17)$$

где  $C_x$  – концентрации аналита в исследуемой пробе;  $C_{ст.}$  – концентрация аналита в растворе внешнего стандарта;  $\frac{S_x}{S_{доп.ст.}}$  и  $\frac{S_{ст}}{S_{доп.ст.}}$  – отношение площади пика аналита к площади пика дополнительного стандарта, полученные в результате анализа исследуемого образца и внешнего стандарта.

Важно отметить, принципиальное отличие в последовательности операций усреднения экспериментальных данных и собственно вычисления концентрации аналита для соотношений «традиционного» (2) и модифицированного (17) вариантов внешнего стандарта. В случае уравнения (17) значения  $S_x$ ,  $S_{доп.ст.}$  и отношение  $\frac{S_x}{S_{доп.ст.}}$  для исследуемого образца, так же как  $S_{ст.}$ ,  $S_{доп.ст.}$  и  $\frac{S_{ст}}{S_{доп.ст.}}$  для градуировочного раствора определяют из одних и тех же соответствующих хроматограмм (то есть они не являются статистически независимыми), поэтому сначала вычисляют отношения площа-

дей, а только после этого проводят их усреднение для получения конечных результатов.

Преимущества рассматриваемого подхода обусловлены тем, что в уравнении для оценки относительной погрешности результатов ( $\delta C_x$ ) фигурируют не относительные стандартные отклонения абсолютных площадей пиков, а относительные стандартные отклонения их отношений, которые гораздо меньше (18):

$$\delta C_x \approx \sqrt{\delta \left( \frac{S_x}{S_{\text{доп.ст.}}} \right)^2 + \delta \left( \frac{S_{\text{ст}}}{S_{\text{доп.ст.}}} \right)^2} \quad (18)$$

Перейдём к практическому доказательству более высокой повторяемости результатов, полученных при использовании модифицированного варианта внешнего стандарта. Для этого рассмотрим данные табл. 7, полученные при анализе модельной смеси, состоящей из 3-метилбутан-1-ола и гексан-1-ола в пропан-2-оле (экспериментальные данные в *приложении В*).

**Таблица 7.** Результаты количественного хроматографического анализа модифицированным и традиционным вариантами метода внешнего стандарта.

Заданная концентрация изопентанола, мг/мл	Результат определений методом внешнего стандарта, $C \pm s(C)$ , мг/мл	
	«Традиционный» вариант	Модифицированный
18.3	$19.8 \pm 1.1$	<b><math>18.3 \pm 0.1</math></b>
Относительное стандартное отклонение концентрации, %	5.5	<b>0.7</b>

Результаты определения концентрации изопентанола, как «традиционным», так и модифицированным вариантами метода внешнего стандарта хорошо «попадают» в заданную по приготовлению концентрацию. Однако модифицированный вариант предоставляет значительно более точные результаты. Во-первых, найденное значение концентрации совпадает с заданным. Во-вторых, стандартное отклонение результата модифицированным вариантом значительно меньше и в-третьих относительное стандартное отклонение определения концентрации меньше почти в 8 раз.

### 3.3.2. Метод стандартной добавки

Повторяемость традиционного варианта метода стандартной добавки также чрезвычайно чувствительна к неконтролируемым потерям образца при его дозировании в хроматографическую систему и стабильности хроматографического режима. Для устранения этого недостатка разумно воспользоваться относительными параметрами, таким образом, основное расчётное уравнение приобретает вид (19). Кроме этого соотношение для расчёта коэффициента вариации также подвергается замене абсолютных площадей относительными параметрами (20).

$$m_x = \frac{m_{\text{добавки}} * \left( \frac{S_x}{S_{\text{доп.ст.}}} \right)}{\left( \frac{S_{x+\text{добавка}}}{S_{x+\text{добавка}+\text{доп.ст.}}} \right) - \left( \frac{S_x}{S_{\text{доп.ст.}}} \right)} \quad (19)$$

$$\delta m_x = \frac{\left( \frac{S_{x+\text{добавка}}}{S_{x+\text{добавка}+\text{доп.ст.}}} \right)}{\left( \frac{S_{x+\text{добавка}}}{S_{x+\text{добавка}+\text{доп.ст.}}} \right) - \left( \frac{S_x}{S_{\text{доп.ст.}}} \right)} \sqrt{\delta \left( \frac{S_x}{S_{\text{доп.ст.}}} \right)^2 + \delta \left( \frac{S_{x+\text{добавка}}}{S_{x+\text{добавка}+\text{доп.ст.}}} \right)^2} \quad (20)$$

где  $m_x$  – масса аналита в исследуемой пробе;  $m_{\text{добавки}}$  – масса добавки аналита к исследуемому образцу;  $\frac{S_x}{S_{\text{доп.ст.}}}$  и  $\frac{S_{\text{ст}}}{S_{\text{доп.ст.}}}$  – отношение площади пика аналита к площади пика дополнительного стандарта, полученные в результате анализа исследуемого образца и образца с добавкой аналита;  $\delta m_x$  – относительное стандартное отклонение определения массы аналита в образце.

Для того чтобы показать все преимущества предлагаемой модификации в качестве примера количественного расчёта взята выборка площадей пиков хлорбензола (аналит) и 1,2,4-триметилбензола (дополнительный стандарт) (*приложение Г*). В данном случае дозирование модельной смеси осуществляли сильно изношенным шприцем, из-за чего коэффициент вариации площадей достигал 50%. Вполне ожидаемо, что при таком разбросе площадей результаты количественного анализа с использованием «классического» варианта метода стандартной добавки совершенно неудовлетворительны (табл. 8).

**Таблица 8.** Результаты количественного хроматографического анализа модифицированным и «традиционным» вариантами метода стандартной добавки.

Заданная концентрация хлорбензола, мг/мл	Результат определений методом стандартной добавки, $C \pm s(C)$ , мг/мл	
	«Традиционный» вариант	Модифицированный
26.4	$11 \pm 10$	<b><math>24.2 \pm 0.8</math></b>
Относительное стандартное отклонение концентрации, %	89	<b>3</b>

Несмотря на это, модифицированный вариант даёт вполне хорошие результаты, относительное стандартное отклонение концентрации хлорбензола составило всего 3% и, хотя расчётное значение концентрации хлорбензола немного не совпадёт с заданным по приготовлению значением, оно всё равно приемлемо, так как расходится с ним всего на ~8%. Из этого можно заключить, что введение относительных параметров в методе стандартной добавки позволяет значительно скомпенсировать потери образца на стадии его дозирования и позволяет использовать для количественного анализа даже те экспериментальные данные, которые в случае «классического» варианта совершенно непригодны.

### 3.3.3. Метод абсолютной градуировки

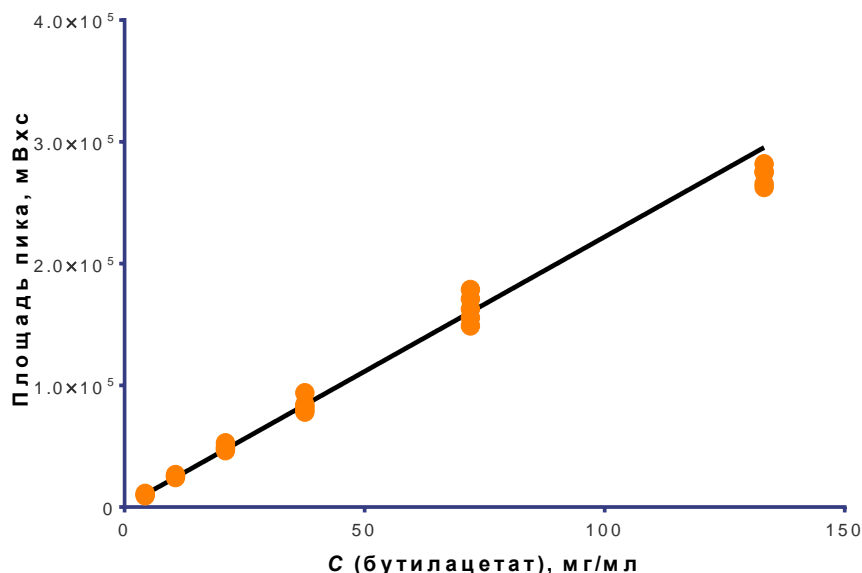
Метод абсолютной градуировки, как и рассмотренные выше, предполагает измерение абсолютных площадей хроматографических пиков. Неучтенные потери градуировочных растворов на стадии дозирования могут существенно исказить параметры регрессионных уравнений, так что компенсация обусловленных этими потерями ошибок с использованием дополнительных стандартов представляется весьма полезной [27,28]. Следует, правда, отметить, что преимущества количественного анализа этим способом несколько менее «эффектны» из-за большего числа экспериментальных операций и некоторого усложнения обработки результатов. Поскольку градуировку проводят с использованием серии растворов, содержащих целевые аналиты в некотором диапазоне концентраций, то это объясняет целесообразность использования не одной, а нескольких добавок дополнительных стандартов. Их количества

должны отличаться в каждом из градуировочных образцов, желательно так, чтобы  $C_{\text{доп.ст.}} \approx C_{\text{аналит.}}$

Особенности использования дополнительных стандартов в методе абсолютной градуировки можно проиллюстрировать на примере бутилацетата (аналит) при выборе изопропилбутаноата в качестве дополнительного стандарта. В *приложении Д* приведены исходные данные, полученные при анализе градуировочных растворов. Исходя из них, произведён расчёт уравнения линейной регрессии, полученного по «классическому» варианту метода абсолютной градуировки (табл. 9) и построен соответствующий градуировочный график (рис. 10).

**Таблица 9.** Параметры линейного уравнения регрессии, вычисленные для «классического» варианта абсолютной градуировки

$C = a \times S + b$ Весовой коэффициент $1/C^2$			
Коэффициент детерминации ( $R^2$ )	Максимальная относительная ошибка аппроксимации ( $A_{\text{max}}$ ), %	Параметры уравнения регрессии	
		$a \pm SD_a$	$b \pm SD_b$
0.9915	<b>12.0</b>	$2210 \pm 39$	$904.2 \pm 366.8$

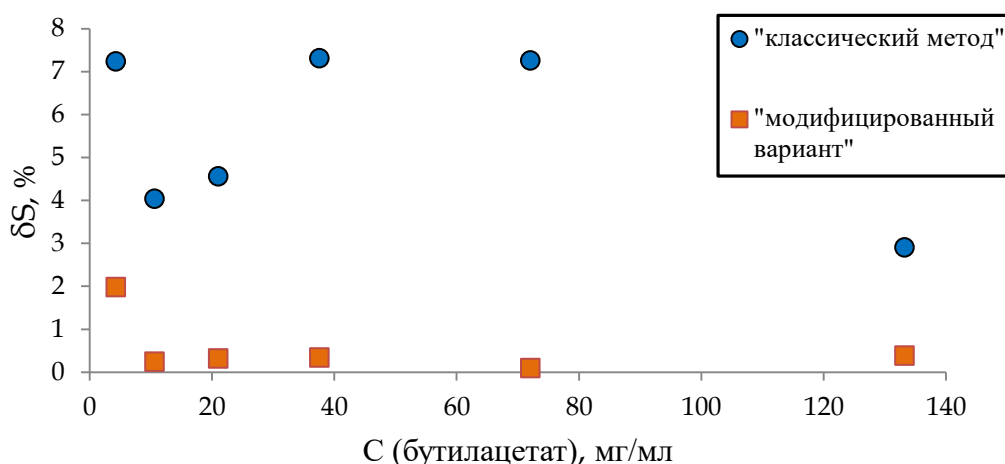


**Рисунок 10.** Градуировочный график, построенный по «классическому» варианту абсолютной градуировки

Можно видеть, что в данном случае есть небольшой разброс площадей пиков для градуировочных растворов, из-за чего коэффициент детерминации не слишком

высок (0.9915), хотя максимальная относительная ошибка аппроксимации всё ещё остаётся на приемлемом уровне в 12 %.

При всём этом замена абсолютных площадей пиков на относительные параметры имеет смысл. Это можно понять взглянув на рис. 11, на котором приведён график «коэффициент вариации площадей бутилацетата ( $\delta S$ ) – концентрация ( $C$ ) бутилацетата для градуировочных растворов» для классического метода абсолютной градуировки и « $\delta S$  относительных параметров бутилацетат/изопропилбутират –  $C_{\text{бутилацетат}}$ » для модифицированного варианта.



**Рисунок 11.** Графики  $\delta S$  (бутилацетат) –  $C$  (бутилацетат) для «классического» метода абсолютной градуировки и  $\delta S$  (бутилацетат/изопропилбутират) –  $C$  (бутилацетат) для модифицированного варианта метода абсолютной градуировки

Коэффициенты вариации относительных параметров для всех градуировочных растворов ниже этих же показателей для абсолютных площадей бутилацетата. Исходя из этого построено регрессионное уравнение (табл. 10) и соответствующий градуировочный график (рис. 12).

Так как в данном конкретном примере концентрации дополнительного стандарта в градуировочных растворах отличаются, то для их согласования относительные параметры умножали на коэффициент пропорциональности (21), нивелирующий эту разницу.

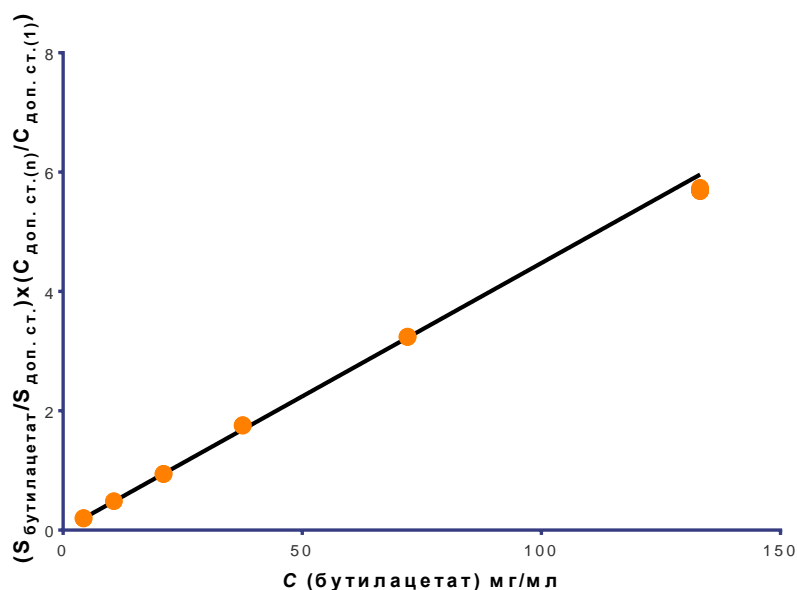
$$C_{\text{доп.ст. (n)}}/C_{\text{доп.ст. (1)}} \quad (21)$$

где  $C_{\text{доп.ст. (n)}}$  и  $C_{\text{доп.ст. (1)}}$  – концентрация дополнительного стандарта в n-ом градуировочном растворе и в 1-ом соответственно.

Видно, что замена абсолютных площадей относительными параметрами устраняет разброс точек, отчётливо заметный на рис. 10. Коэффициент детерминации при этом вырос до 0.9988, а максимальная относительная ошибка аппроксимации снизилась до 4.7 %.

**Таблица 10.** Параметры линейного уравнения регрессии, вычисленные для «модифицированного» варианта абсолютной градуировки

$C = a' \times \left( \frac{S}{S_{\text{доп.ст.}}} \right) \times \left( \frac{C_{\text{доп.ст. (n)}}}{C_{\text{доп.ст. (1)}}} \right) + b'$ <p>Весовой коэффициент <math>1/C^2</math></p>			
$R^2$	$A_{\text{max}}, \%$	Параметры уравнения регрессии	
		$a \pm SD_a$	$b \pm SD_b$
0.9988	<b>-4.7</b>	$(4.47 \pm 0.03) \times 10^{-2}$	$(6.97 \pm 2.82) \times 10^{-3}$



**Рисунок 12.** Градуировочный график, построенный по «модифицированному» варианту абсолютной градуировки

Таким образом, небольшое усложнение вычислений, обусловленное использованием дополнительного стандарта и расчётом согласующего коэффициента, приво-



дит к существенному снижению случайной погрешности анализа методом абсолютной градуировки.

### 3.3.4. Растворитель пробы в качестве дополнительного стандарта

В рассматриваемой модификации способов количественного анализа существует еще один весьма привлекательный на практике способ ее реализации. В качестве дополнительного стандарта можно использовать растворитель, несмотря на то, что его содержание в образцах, как правило, существенно превышает содержание целевых компонентов ( $C_{\text{раств}} \gg C_x$ ). Такой прием требует нескольких специальных комментариев.

Концентрации целевых компонентов в изучаемых образцах и соответствующих им растворах внешних стандартов (условно обозначены цифрой 1), а также до (2) и после (3) стандартной добавки, несколько отличаются. Следовательно, несколько отличаются и концентрации растворителя. Однако поскольку во всех случаях значения  $C_{\text{раств}}$  значительно превышают величины концентраций аналитов, то относительно небольшими различиями между  $C_{\text{раств}}(1) \geq C_{\text{раств}}(2) \geq C_{\text{раств}}(3)$  можно пренебречь.

Во-вторых, в зависимости от используемых для разделения компонентов образцов колонок, объемов дозируемых образцов и температурных режимов хроматографического анализа следует обсудить возможность массовой перегрузки колонки и/или детектора. Если для разделения используют капиллярные колонки, то по низкипящим растворителям как основным компонентам проб они практически всегда оказываются перегруженными. Это проявляется в значительном уширении их пиков и асимметрии (появлении «хвостов») [29]. Однако эти эффекты чаще всего не связаны с перегрузкой пламенно-ионизационного детектора (ПИД) и, следовательно, с искажением площадей таких деформированных пиков. Перегрузка детектора может наблюдаться только при использовании насадочных колонок и/или при чрезмерно высоких температурах разделения, когда пики становятся слишком «узкими».

Ближайшим аналогом рассматриваемой модификации способов количественного анализа является подход, разрабатываемый С.В. Черепицей (Минск, Беларусь). При определении примесей в этиловом спирте и алкогольной продукции методом внутреннего стандарта в качестве такого стандарта предложено использовать основной компонент – этанол [30,31]. Однако существенным отличием этого варианта от

рассматриваемого нами представляется то, что метод внутреннего стандарта предполагает предварительное определение градуировочных коэффициентов примесей относительно стандарта, а в нашем случае это не требуется.

Небезынтересно заметить, что основные положения рассматриваемого подхода (выбор основных компонентов матриц в качестве стандартов) хорошо известны и их применяют в различных аналитических методах, в частности, атомно-эмиссионной спектроскопии [32]. Однако по нашим данным в хроматографии такой прием до настоящего времени не использовали.

Для примера использования растворителя в качестве дополнительного стандарта выбраны экспериментальные данные, полученные в результате ГХ анализа модельной смеси, состоящей из изопропил п-ксилола (аналит) и октана (растворитель) (*приложение E*), дозирование смеси осуществлялось автоматическим дозатором жидких образцов (автосэмплером).

Для количественного определения изопропил п-ксилола выбран метод внешнего стандарта. Несмотря на использование автосэмплера для ввода образцов, относительное стандартное отклонение концентрации составило 11% (табл. 11). В то время как подстановка в расчётное уравнение вместо абсолютных площадей отношений площадей изопропил п-ксилол/октан позволило снизить коэффициент вариации концентрации аналита до 1.5 %. К тому же модифицированный вариант метода внешнего стандарта даёт значения концентрации аналита немного ближе к заданной по приготовлению величине.

**Таблица 11.** Результаты количественного хроматографического анализа модифицированным и «классическим» вариантами метода стандартной добавки.

Заданная концентрация изопропил п-ксилола, мг/мл	Результат определений методом стандартной добавки, $C \pm s(C)$ , мг/мл	
	«Традиционный» вариант	Модифицированный
4.26	$4.2 \pm 0.5$	<b><math>4.25 \pm 0.06</math></b>
Относительное стандартное отклонение концентрации, %	11.3	<b>1.5</b>

В заключение, следует сказать, что даже использование автосэмплера не всегда позволяет избежать потерь образцов при их дозировании в хроматографическую систему. При этом предлагаемый нами подход, основанный на использовании относительных параметров, позволяет избежать влияния таких потерь на результаты анализа, к тому же его реализация очень проста и не требует больших затрат времени.

### 3.4. Проверка применимости модифицированных методов количественно анализа в методах ВЭЖХ и КЗЭ.

В жидкостной хроматографии для ввода проб, как правило, используют петлю известного объёма, поэтому потери проб в этом методе много меньше в сравнении с газовой хроматографией, однако даже в этом случае они есть, и повторяемость площадей пиков аналита здесь также можно увеличить, используя относительные параметры. В табл. 12 приведены значения площадей пиков целевого компонента – бутирофенона и, кроме этого, площади пиков дополнительного стандарта – нитробензола, их относительные параметры и коэффициенты вариации, полученные при анализе модельной смеси.

**Таблица 12.** Экспериментальные значения площадей пиков бутирофенона и нитробензола полученные с использованием ВЭЖХ. А также вычисленные по ним относительные параметры и коэффициенты вариации.

Компонент	Значения $S_i$ или $\frac{S_i}{S_{\text{доп.ст}}}$	Коэффициент вариации, %
Бутирофенон (аналит)	2200; 1963; 2224; 2223; 2170; 2211; 2232; 2234; 2225; 2235	3.8 ( $\delta_1$ )
Нитробензол (доп. стандарт)	3809; 3473; 3856; 3829; 3740; 3810; 3842; 3859; 3864; 3862	3.1
Относительные параметры	0.58; 0.57; 0.58; 0.58; 0.58; 0.58; 0.58; 0.58; 0.58; 0.58	0.8 ( $\delta_2$ )
Уменьшение неопределённости результатов ( $\delta_1/\delta_2$ )		<b>4.8</b>

Несмотря на то, что в данном случае выигрыш в повторяемости относительных параметров, меньше чем в газовой хроматографии (4.8 раза), однако скромные усилия, направленные на реализацию предлагаемого подхода делают его применение целесообразным.

А вот в методе капиллярного электрофореза использование модифицированных вариантов методов количественного анализа весьма оправдано. Дело в том, что объём вводимых проб в данном методе крайне мал, и если он производится за счёт перепада давления, то его прецизионность находится на уровне газовой хроматографии или даже ниже, что иллюстрирует табл. 13. В которой представлены экспериментальные данные, полученные при определении бензойной кислоты в модельной смеси.

**Таблица 13.** Экспериментальные значения площадей пиков бензойной и п-метилбензойной кислот полученные с использованием капиллярного зонного электрофореза. И вычисленные по ним относительные параметры с коэффициентами вариации.

Компонент	Значения $S_i$ или $\frac{S_i}{S_{\text{доп.ст}}}$	Коэффициент вариации, %
Бензойная кислота (аналит)	29.3; 27.9; 27.0; 28.2; 27.4; 28.6; 26.3; 26.2; 26.8; 25.9	4.1 ( $\delta_1$ )
п-Метилбензойная кислота (доп. стандарт)	13.4; 12.8; 12.4; 12.8; 12.4; 13.1; 12.1; 12.0; 12.2; 11.8	4.2
Относительные параметры	2.18; 2.19; 2.19; 2.20; 2.20; 2.18; 2.18; 2.19; 2.19; 2.19	( $\delta_2$ ) 0.4
Уменьшение неопределённости результатов ( $\delta_1/\delta_2$ )		<b>10</b>

Можно видеть, что в данном случае введение относительных параметров позволило повысить повторяемость в 10 раз, по сравнению с использованием абсолютных площадей пиков бензойной кислоты.

## Выводы

1) С целью компенсации случайных погрешностей количественного хроматографического анализа, вызванных частичными потерями проб на стадии их дозирования и нестабильностью режима анализа, предложен способ модификации трёх его методов: внешнего стандарта, абсолютной градуировки и стандартной добавки. Модификация основана на замене абсолютных количественных параметров пиков относительными параметрами (отношением площадей аналит/дополнительный стандарт) и позволяет заметно увеличить повторяемость результатов;

2) Сформулированы требования к дополнительным стандартам и показано, что они не эквивалентны требованиям к внутренним стандартам в одноименном методе количественного анализа. Главными отличиями являются отсутствие ограничений на их химическую природу и необходимость задания содержания в образцах. Экспериментально подтверждена возможность использования растворителя в качестве дополнительного стандарта;

3) Подтверждена высокая стабильность относительных параметров в условиях разбавления пробы и варьировании её объёма при вводе в хроматографическую систему;

4) Установлено, что применение дополнительных стандартов позволяет до 50 раз повысить повторяемость результатов количественного анализа при использовании относительных площадей пиков вместо абсолютных;

5) Предлагаемый подход охарактеризован в методах газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза. Показано, что наилучшие результаты количественного анализа модифицированными методами достигаются в условиях газохроматографического анализа.

## Список литературы

1. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Уменьшение погрешностей хроматографического анализа методами внешнего стандарта и стандартной добавки за счет использования дополнительных стандартов // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 4. С. 302–309.
2. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. и др. Практическая газовая и жидкостная хроматография. Санкт-Петербург: Издательство С. - Петербургского университета, 2002. 612 с.
3. Asnin L.D. Peak measurement and calibration in chromatographic analysis // TrAC - Trends Anal. Chem. 2016. Т. 81. С. 51–62.
4. Cuadros-Rodríguez L. и др. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences // J. Chromatogr. A. 2007. Т. 1158, № 1–2. С. 33–46.
5. Морозова Т.Е. и др. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-триметилгидразиний) - пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования (электроспрей) // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17, № 2. С. 184–189.
6. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review // TrAC - Trends Anal. Chem. 2016. Т. 77. С. 167–185.
7. Gu H. и др. Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weighting factors on curve stability, data quality, and assay perfo // Anal. Chem. 2014. Т. 86, № 18. С. 8959–8966.
8. Jain R.B. Comparison of three weighting schemes in weighted regression analysis for use in a chemistry laboratory // Clin. Chim. Acta. 2010. Т. 411, № 3–4. С. 270–279.
9. Almeida A.M., Castel-Branco M.M., Falcão A.C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods // J. Chromatogr. B. 2002. Т. 774, № 2. С. 215–222.
10. Miller J.N. Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review // Analyst. 1991. Т. 116, № 1. С. 3–14.

11. Dolan J.W. Calibration Curves III: A Different View // LCGC North Am. 2009. T. 27, № 5. C. 392–400.
12. Dolan J.W. Calibration Curves, Part V: Curve Weighting // LCGC North Am. 2009. T. 27, № 7. C. 534–540.
13. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation // U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. 2001. № May. C. 4–10.
14. Rumel D. Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods. Resolution-RE n. 899 // Agência Nac. Vigilância Sanitária. 2003.
15. Bratinova S., Raffael B., Simoneau C. Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials. 2009. 74 с.
16. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
17. Zenkevich I.G., Klimova I.O. Use of the standard addition method in quantitative chromatographic analysis // J. Anal. Chem. 2006. T. 61, № 10. C. 967–972.
18. Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry. 1-е изд. / под ред. Hansen S.H., Pedersen-Bjergaard S. John Wiley & Sons, 2015. 336 с.
19. Ярошенко Д.В. Нивелирование влияния биологической матрицы при определении лекарственных препаратов в плазме крови методом хромато-масс-спектрометрии. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Санкт-Петербург, 2014. 153 с.
20. Зенкевич И.Г., Королев К.М. Новые возможности количественного хроматографического анализа методом двойного внутреннего стандарта // Аналитика и контроль. 2014. Т. 18, № 4. С. 469–476.
21. Encyclopedia of Chromatography / под ред. Cazes J. Marcel Dekker Inc., 2001. 927 с.
22. Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide. Academic Press, 2011. 632 с.
23. Родинков О.В., Бокач Н.А., Булатов А.В. Основы метрологии физико - химических измерений и химического анализа. Санкт-Петербург: BBM, 2010. 136 с.
24. Kuznetsov V. V., Larin S.L., Romanenko S. V. Detection algorithm of a series

of releases by Dikson criterion in inversion voltammetry // Аналитика и контроль. 2014. Т. 18, № 3. С. 310–315.

25. NIST Standard Reference Database Number 69 [Электронный ресурс] // National Institute of Standards and Technology. URL: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (дата обращения: 07.05.2017).

26. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Уменьшение случайных погрешностей количественного хроматографического анализа при использовании растворителя в качестве дополнительного стандарта // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20, № 2. С. 147–153.

27. Зенкевич И.Г., Прокофьев Д.В. Использование дополнительных стандартов для повышения точности методов количественного хроматографического анализа // Журн. аналит. химии. 2017. Т. 72, № 5. С. 437–447.

28. Прокофьев Д.В., Зенкевич И.Г. Количественный хроматографический анализ методом абсолютной градуировки с использованием дополнительного стандарта // Вестник СПбГУ. Сер. 4. Физика. Химия. 2016. Т. 3 (61), № 3. С. 337–344.

29. Zenkevich I.G., Pavlovskii A.A. Overloading control of gas chromatographic systems // J. Sep. Sci. 2015. Т. 38, № 16. С. 2848–2856.

30. Черепица С.В. и др. Использование основного компонента (растворителя) в качестве внутреннего стандарта при газохроматографическом определении примесей // Журн. аналит. химии. 2003. Т. 58, № 4. С. 416–420.

31. Charapitsa S. V. и др. Direct determination of volatile compounds in spirit drinks by gas chromatography // J. Agric. Food Chem. 2013. Т. 61, № 12. С. 2950–2956.

32. Дробышев А.И. Основы атомного спектрального анализа. Изд. С-Пет. Санкт-Петербург, 1997. 200 с.



## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение А

Экспериментальные данные, полученные при последовательном разбавлении  
модельной смеси хлорбензола и о-ксилола.

Разбавление, раз	2	4	8	16
$S_i$ хлорбензол	21068	10599	5643	2806
	19042	11150	5140	2765
	21431	10033	5150	2870
	18902	10341	5410	2745
	20178	10410	5049	2708
Коэффициент вариации, %	5.7	3.9	4.6	2.2
$S_i$ о-ксилол	23274	11696	6235	3097
	21038	12330	5674	3058
	23673	11075	5692	3177
	20835	11434	5981	3037
	22284	11508	5574	2984
Коэффициент вариации, %	5.8	4.0	4.7	2.3
Отношение $S_i$ хлорбензол/о-ксилол	0.905	0.906	0.905	0.906
	0.905	0.904	0.906	0.904
	0.905	0.906	0.905	0.904
	0.907	0.904	0.905	0.904
	0.906	0.905	0.906	0.908
Коэффициент вариации, %	0.1	0.1	0.1	0.2

## Приложение Б.

Экспериментальные данные, полученные при варьировании объёма вводимой в испаритель газового хроматографа модельной смеси ацетофенона и бутилбутаноата в гексане

Объём вводимой пробы	2 мкл	1 мкл	0.5 мкл	0.3 мкл	0.1 мкл
$S_i$ ацетофенон	21832; 25184; 23752; 23386; 25001	10166; 9599; 9779; 9282; 9136	4831; 4544; 4315; 4697; 4627	2548; 2926; 2792; 2524; 2752	1150; 909; 1206; 565; 975
Коэффициент вариации, %	5.7	4.3	4.2	6.1	25.4
$S_i$ бутилбутаноат	24109; 27721; 26576; 26242; 27283	11319; 10740; 10827; 10352; 10148	5352; 5081; 4781; 5223; 5180	2828; 3238; 3092; 2805; 3051	1251; 993; 1311; 636; 1052
Коэффициент вариации, %	5.3	4.3	4.2	6.3	26.3
Отношение $S_i$ ацетофенон/бутилбутаноат	0.9056; 0.9085; 0.8937; 0.8912; 0.9163	0.8981; 0.8938; 0.9032; 0.8966; 0.9003	0.9026; 0.8943; 0.9025; 0.8993; 0.8933	0.9011; 0.9035; 0.9031; 0.8998; 0.9021	0.9189; 0.9162; 0.9201; 0.8881; 0.9272
Коэффициент вариации, %	1.2	0.4	0.5	0.2	1.7

## Приложение В

Исходные экспериментальные данные для количественного анализа «классическим» и модифицированным вариантами метода внешнего стандарта

Компонент	Значения $S_i$ или $\frac{S_i}{S_{\text{доп.ст}}}$	Среднее значение	Стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение, %
Анализируемый образец				
Изопентанол	35578; 35179; 36089; 35718; 35116; 37412; 37147; 36795; 38041; 37944; 37340; 38120; 37924; 38645; 38455; 39064; 38684; 38560; 38557; 39303; 38391; 39240	37605	1323	3.5
Гексан-1-ол	39449; 39001; 40044; 39693; 38973; 41423; 41182; 40778; 42162; 42131; 41353; 42301; 42030; 42948; 42676; 43364; 42815; 42827; 42746; 43499; 42603; 43479	41704	1461	3.5
Относительный параметр	0.902; 0.902; 0.901; 0.900; 0.901; 0.903; 0.902; 0.902; 0.902; 0.901; 0.903; 0.901; 0.902; 0.900; 0.901; 0.901; 0.904; 0.900; 0.902; 0.904; 0.901; 0.903	0.902	0.001	0.1
Градуировочный раствор				
Изопентанол	68869; 70483; 67382; 68124; 68813; 68795; 67079; 68753; 69025; 70201; 69238; 74059; 75272; 74932; 76719; 74314; 73365; 73503; 68629; 73144; 73915; 74130	71307	3000	4.2
Гексан-1-ол	36355; 37609; 36355; 36575; 37028; 37093; 36169; 37308; 37316; 37989; 37346; 40314; 40860; 40318; 41302; 39874; 39449; 39364; 37186; 39447; 40046; 39863	38417	1661	4.3
Относительный параметр	1.89; 1.87; 1.85; 1.86; 1.86; 1.85; 1.85; 1.84; 1.85; 1.85; 1.85; 1.84; 1.84; 1.86; 1.86; 1.86; 1.86; 1.87; 1.85; 1.85; 1.85; 1.86	1.86	0.01	0.7

## Приложение Г

Исходные экспериментальные данные для количественного анализа «классическим» и модифицированным вариантами метода стандартной добавки

Компонент	Значения $S_i$ или $\frac{S_i}{S_{\text{доп.ст}}}$	Среднее значение	Стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение, %
Анализируемый образец				
Хлорбензол	20040; 31018; 16530; 13822; 31945; 11068; 35003; 32016; 18126; 13739; 18138; 21250; 26148; 31400; 2763; 10476; 32203; 28011; 3896; 23477; 5603; 6079	19671	10351	53
Псевдокумол	22078; 34317; 18522; 15325; 36375; 12214; 39399; 35770; 20207; 15577; 20408; 23898; 29498; 35870; 3033; 11932; 36578; 31578; 4282; 26178; 6299; 7025	22107	11690	53
Относительный параметр	0.91; 0.90; 0.89; 0.90; 0.88; 0.91; 0.89; 0.90; 0.90; 0.88; 0.89; 0.89; 0.89; 0.88; 0.91; 0.88; 0.88; 0.89; 0.91; 0.90; 0.89; 0.87	0.89	0.01	1.4
Образец с добавкой аналита				
Хлорбензол	39378; 86771; 85111; 86950; 88431; 85754; 82586; 76504; 78243; 66942; 61982; 59298; 26176; 43299; 57579; 57509; 47247; 39582; 31981; 64150	63274	20185	32
Псевдокумол	21379; 46953; 46420; 47258; 48375; 46774; 45462; 42143; 42941; 37167; 34385; 33044; 14709; 23929; 31937; 31855; 26161; 22115; 17660; 35666	34817	10900	31
Относительный параметр	1.84; 1.85; 1.83; 1.84; 1.83; 1.83; 1.82; 1.82; 1.82; 1.80; 1.80; 1.79; 1.78; 1.81; 1.80; 1.81; 1.81; 1.79; 1.81; 1.80	1.81	0.02	1

## Приложение Д

Исходные данные для вычисления параметров уравнения линейной регрессии метода абсолютной градуировки при использовании абсолютных и относительных площадей пиков (определяемый компонент бутилацетат, дополнительный стандарт – изопропилбутират)

$C_{\text{бутилацетат}}$	$C_{\text{доп. ст.}}$	$S_{\text{бутилацетат}}$	$S_{\text{доп. ст.}}$	$(S_{\text{бутилацетат}}/S_{\text{доп.ст.}}) \times [C_{\text{доп.ст.(n)}}/C_{\text{доп.ст.(1)}}]$
4.3	20.8	9412; 9454; 10388; 10224; 11180	48260; 48892; 51239; 52409; 55995	0.195; 0.193; 0.203; 0.195; 0.200
10.6	20.7	26655; 25216; 24361; 26275; 24537	54809; 51946; 50116; 54259; 50733	0.486; 0.485; 0.486; 0.484; 0.484
21.0	20.4	52626; 49062; 48357; 49757; 46482	55004; 50935; 50436; 51877; 48231	0.938; 0.945; 0.940; 0.941; 0.945
37.6	91.4	93830; 82634; 79877; 84252; 78103	233577; 205884; 200078; 210209; 195914	1.761; 1.759; 1.750; 1.757; 1.747
72.0	87.6	178609; 162600; 155436; 170947; 148907	231955; 210713; 201513; 221527; 193127	3.237; 3.244; 3.243; 3.244; 3.241
133.2	81.0	274740; 275714; 265480; 262498; 281772	188002; 188234; 179879; 178893; 192526	5.680; 5.693; 5.736; 5.703; 5.689

## Приложение Е

Исходные экспериментальные данные для количественного анализа изопропил-п-ксилола по «классическому» и модифицированному вариантам метода внешнего стандарта с использованием растворителя (октана) в качестве дополнительного стандарта

Компонент	Значения $S_i$ или $\frac{S_i}{S_{\text{доп.ст}}}$	Среднее значение	Стандартное отклонение	Относительное стандартное отклонение, %
Анализируемый образец				
Октан (растворитель)	1116376; 1397953; 1262563; 1214525; 1091285; 1135590; 1352490; 1331938; 1342492; 1261928	1250714	108193	8.7
Изопропил-п-ксилол (4.26 мг/мл)	8425; 10733; 9653; 9239; 8006; 8433; 10330; 10061; 10094; 9491	9446	911	9.6
Относительный параметр	$7.547 \times 10^{-3}$ ; $7.678 \times 10^{-3}$ ; $7.646 \times 10^{-3}$ ; $7.607 \times 10^{-3}$ ; $7.336 \times 10^{-3}$ ; $7.426 \times 10^{-3}$ ; $7.637 \times 10^{-3}$ ; $7.554 \times 10^{-3}$ ; $7.519 \times 10^{-3}$ ; $7.521 \times 10^{-3}$	$7.55 \times 10^{-3}$	$0.15 \times 10^{-3}$	1.4
Градуировочный раствор				
Октан (растворитель)	1422347; 1257056; 1249202; 1209479; 1291157; 1273349; 1314524; 1228506; 1193150; 1183010	1262178	70314	5.6
Изопропил-п-ксилол (8.52 мг/мл)	21633; 18997; 18889; 18168; 19550; 19253; 20078; 18782; 17975; 17853	19118	1127	5.9
Относительный параметр	$1.521 \times 10^{-2}$ ; $1.511 \times 10^{-2}$ ; $1.512 \times 10^{-2}$ ; $1.502 \times 10^{-2}$ ; $1.514 \times 10^{-2}$ ; $1.512 \times 10^{-2}$ ; $1.527 \times 10^{-2}$ ; $1.529 \times 10^{-2}$ ; $1.507 \times 10^{-2}$ ; $1.509 \times 10^{-2}$	$1.51 \times 10^{-2}$	$0.01 \times 10^{-2}$	0.6